

---

Aus dem Lehrstuhl für Abfall- und Stoffstromwirtschaft  
der Agrar- und Umweltwissenschaftlichen Fakultät

# **Spurenelementkonzentrationen und biologische Aktivität in NaWaRo-Biogasfermentern**

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Ingenieurwissenschaften (Dr.-Ing.)

An der Agrar- und Umweltwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Rostock

Vorgelegt von    Dipl.-Ing. Nils Engler  
aus                Rostock

---

**Gutachter:**

1. Gutachter:

Prof. Dr.-Mont. Michael Nelles  
Lehrstuhl Abfall- und Stoffstromwirtschaft  
Universität Rostock

2. Gutachter:

Prof. Dr.-Ing. Martin Kranert  
Lehrstuhl für Abfallwirtschaft und Abluft  
Universität Stuttgart

3. Gutachter:

Dr.-Ing. Jan Liebetrau  
Bereichsleiter Biochemische Konversion  
Deutsches Biomasse-Forschungszentrum Leipzig

Datum der Einreichung: 7.10.2014

Datum der Verteidigung: 28.5.2015

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINFÜHRUNG UND ZIELSTELLUNG .....</b>	<b>6</b>
1.1. PROBLEMSTELLUNG .....	6
1.2. ZIELE DER ARBEIT .....	8
<b>2. GRUNDLAGEN UND STAND DER FORSCHUNG .....</b>	<b>11</b>
2.1. FUNKTION VON SPURENELEMENTEN IM STOFFWECHSEL DER ORGANISMEN .....	11
2.2. BIOCHEMIE DES ANAEROBEN ABBAUS VON BIOMASSE .....	12
2.3. BEDEUTUNG EINZELNER SPURENELEMENTE FÜR DEN PROZESS DER METHANGÄRUNG .....	15
<b>3. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>22</b>
3.1. ANALYTIK ZUR CHARAKTERISIERUNG DER FERMENTERPROBEN .....	23
3.1.1. <i>Bestimmung der Grundparameter</i> .....	23
3.1.2. <i>Bestimmung der Dichte der Fermenterproben</i> .....	24
3.1.3. <i>Spurenelementanalytik</i> .....	25
3.2. BESTIMMUNG DER BIOLOGISCHEN AKTIVITÄT DER FERMENTERBIOLOGIE .....	26
3.2.1. <i>Standardsubstrat</i> .....	26
3.2.2. <i>Messung der Biogasbildung</i> .....	28
3.2.3. <i>Probenahme und Versuchsvorbereitung</i> .....	31
3.2.4. <i>Versuchsdurchführung</i> .....	32
3.2.5. <i>Auswertung der Messdaten</i> .....	33
3.2.6. <i>Methodenvalidierung</i> .....	36
<b>4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION .....</b>	<b>41</b>
4.1. MESSUNGEN ZUR ABBAULEISTUNG DER FERMENTERBIOLOGIE .....	42
4.1.1. <i>Entwicklung von Bewertungskriterien</i> .....	42
4.1.2. <i>Ergebnisse der Aktivitätsmessungen</i> .....	49
4.2. GEMESSENE SPURENELEMENTKONZENTRATIONEN .....	53
4.3. ZUSAMMENHANG ZWISCHEN SPURENELEMENTVERSORGUNG UND BIOLOGISCHER AKTIVITÄT .....	58
4.3.1. <i>Korrelationsanalyse</i> .....	58
4.3.2. <i>Ableitung von Zielkonzentrationen</i> .....	63
4.3.3. <i>Zielkonzentrationen für Selen und Cobalt</i> .....	79
<b>5. SCHLUSSFOLGERUNGEN UND WEITERER FORSCHUNGSBEDARF .....</b>	<b>83</b>
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>85</b>
<b>7. LITERATUR .....</b>	<b>87</b>

## Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: Reaktion des Propionsäureabbaus und Energiebilanz unter Standardbedingungen nach [26] .....	14
Abbildung 2: Die wichtigsten Reaktionswege der Methanogenese .....	14
Abbildung 3: Beispiel für eine normierte Gasbildungs-Summenkurve mit Erläuterungen .....	35
Abbildung 4: Gassummenkurven Validierungsversuch 1 .....	37
Abbildung 5: Boxplot zum Validierungsversuch 1 .....	38
Abbildung 6: Boxplot zum Validierungsversuch 3 .....	40
Abbildung 7: Relativer Biogasertrag und Verlauf der Regressionskurven für zwei Fermenterproben .....	44
Abbildung 8: Biogasbildung und Verlauf des Gärsäurespektrums bei der Vergärung von reiner Maisstärke .....	45
Abbildung 9: Beispiele für gemessene Gassummenkurven und Lage der Bewertungsparameter $t_{50}$ bzw. $t_{33}$ .....	47
Abbildung 10: Zusammenhang zwischen $t_{50}$ und $t_{33}$ .....	48
Abbildung 11: Zur Ermittlung der Bewertungskriterien aus den Gasbildungskurven von Maisstärke .....	49
Abbildung 12: Gemessene Werte für $t_{50}$ und $t_{33}$ (Sortierung: nach $t_{33}$ , aufsteigend) .....	50
Abbildung 13: Häufigkeitsverteilung der $t_{50}$ -Werte.....	51
Abbildung 14: Häufigkeitsverteilung der $t_{33}$ -Werte.....	52
Abbildung 15: Gemessene Cu-Konzentrationen (aufsteigend sortiert) .....	54
Abbildung 16: Gemessene Se-Konzentrationen (aufsteigend sortiert) .....	54
Abbildung 17: Darstellung der relativen Verhältnisse der Spurenelementkonzentrationen .....	56
Abbildung 18: Qualitativer Zusammenhang zwischen Spurenelementkonzentration und biologischer Aktivität .....	59
Abbildung 19: Zn-Konzentration und $t_{33}$ ( $n = 69$ Fermenterproben) .....	64
Abbildung 20: Klassenmediane $t_{33}$ für Zn .....	66
Abbildung 21: Klassenmediane $t_{33}$ nach Verkleinerung der Klassenbreite im Intervall bis 250 mg/kg <sub>TM</sub> .....	67
Abbildung 22: Klasseneinteilung und Klassenmediane: Cu .....	68
Abbildung 23: Klassenmediane $t_{33}$ für Cu nach Verkleinerung der Klassenbreite im Intervall bis 25 mg/kg <sub>TM</sub> .....	69
Abbildung 24: Klasseneinteilung und Klassenmediane: Fe.....	69
Abbildung 25: Klassenmediane $t_{33}$ für Fe nach Verkleinerung der Klassenbreite.....	70
Abbildung 26: Ni- Konzentrationen und $t_{33}$ ( $n = 69$ Fermenterproben).....	71
Abbildung 27: Klasseneinteilung und Klassenmediane: Ni.....	71
Abbildung 28: Klassenmediane $t_{33}$ für Ni nach Verkleinerung der Klassenbreite .....	72
Abbildung 29 : Klasseneinteilung und Klassenmediane: Mo .....	73
Abbildung 30: Klassenmediane $t_{33}$ für Mo nach Beschränkung des Intervalls und Verkleinerung der Klassenbreite .....	74
Abbildung 31: Klasseneinteilung und Klassenmediane: Mn .....	75
Abbildung 32: Klassenmediane $t_{33}$ für Mn nach Beschränkung des Intervalls und Verkleinerung der Klassenbreite .....	75
Abbildung 33: Klasseneinteilung und Klassenmediane: B .....	76
Abbildung 34: Klassenmediane $t_{33}$ für Bor im Intervall 0...< 20 mg/kg <sub>TM</sub> .....	77
Abbildung 35: Klassenmediane $t_{33}$ für Bor im Intervall 22...< 45 mg/kg <sub>TM</sub> .....	77
Abbildung 36: Klasseneinteilung und Klassenmediane: W.....	78
Abbildung 37: Klassenmediane $t_{33}$ für W im Intervall 0...< 1,2 mg/kg <sub>TM</sub> .....	79
Abbildung 38: Beispiele für normierte Gassummenkurven bei Verwendung von Maisstärke als Substrat.....	80
Abbildung 39: Ermittelte Anstiege $s_2$ der normierten Gassummenkurven aus Maisstärke und Konzentrationen von Se und Co als Gruppenmittelwerte.....	81

## Verzeichnis der Abkürzungen, Formelzeichen und Indizes

Für die Kennzeichnung von physikalischen Einheiten werden die Zeichen entsprechend SI-System, genormt in DIN 1301 T1 [1] sowie die ebenfalls genormten Vorsätze zur Kennzeichnung der dezimalen Teile und Vielfache laut DIN 1301 T2 verwendet. Des Weiteren werden chemische Elemente mit den international verbindlichen Kurzzeichen benannt.

<b>Formelzeichen</b>	<b>Bedeutung</b>	<b>Einheit</b>
c	Konzentration	$\text{mg} \cdot \text{kg}_{\text{TM}}^{-1}$ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
c	Koeffizient der Regressionsfunktion	---
CSB	Chemischer Sauerstoffbedarf	$\text{mg}_{\text{O}_2} \cdot \text{L}^{-1}$
$d\alpha$	Schwellenwert für die Ablehnung der Nullhypothese beim <i>Kolmogorov-Smirnov</i> -Anpassungstest	---
FM	Frischmasse, kennzeichnet die Probe im Originalzustand	g kg
FOS	Gehalt an flüchtigen organischen Säuren, angegeben als Essigsäureäquivalent	$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
g	Beschleunigung: $1\text{g} = 9,81 \text{ m} \cdot \text{s}^{-2}$	$\text{m} \cdot \text{s}^{-2}$
$H_0$	Nullhypothese eines statistischen Tests	
k	Reaktionsgeschwindigkeitskonstante	$\text{s}^{-1}$ $\text{d}^{-1}$
L	Liter	
L(N)	Liter im Normzustand; 1013 kPa / 273,15 K (Volumenangabe für Gase)	
m	Masse	g kg
n	Stoffmenge	mol
oTM	organische Trockenmasse	g
oTS	Anteil organischer Trockenmasse	% d. FM % d. TM
p	Druck	kPa mbar
R	allgemeine Gaskonstante $R = 8.314,41$	$\text{J} \cdot \text{kmol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$
$R^2$	Bestimmtheitsmaß von Regressionskurven $0 < R^2 \leq 1$	---
$r_s$	Rangkorrelationskoeffizient nach SPEARMAN	---
$s_1, s_2$	Anstiege der normierten Gassummenkurve	$\text{d}^{-1}$
T	absolute Temperatur	K
t	Zeit	s d

<b>Formelzeichen</b>	<b>Bedeutung</b>	<b>Einheit</b>
$t_{50}$	Zeit, die benötigt wird um 50% des stöchiometrisch möglichen spezifischen Biogasvolumens zu bilden	d
$t_{33}$	Zeit, die benötigt wird um 33% des stöchiometrisch möglichen spezifischen Biogasvolumens zu bilden	d
TAC	Total Anorganic Carbon : Pufferkapazität des Karbonatpuffersystems	$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{CaCO}_3$
TM	Trockenmasse	g
TS	Trockenmasseanteil	% d. FM
V	Volumen	L $\text{m}^3$
$V_0$	molares Volumen idealer Gase $V_0 = 22,4$	$\text{L(N)} \cdot \text{mol}^{-1}$
VK	Variationskoeffizient	% d. Mittelwertes
$\rho$	Dichte	$\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$
$\theta$	Temperatur	$^{\circ}\text{C}$
$\alpha$	Irrtumswahrscheinlichkeit (bei der Prüfung statistischer Testergebnisse auf Signifikanz)	---

### Abkürzungen

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>	
BGA	Biogasanlage	
CODH	Carbon-Monoxide-Dehydrogenase (ein Enzym)	
ct	Euro-Cent	
EEG	Gesetz für den Vorrang Erneuerbarer Energien (Erneuerbare-Energien-Gesetz)	
Gl.	Gleichung	
NaWaRo	Nachwachsende Rohstoffe	
p.A.	pro Analyse (für die Analyse): kennzeichnet definierte Reinheitsanforderungen bei Laborchemikalien	
vgl.	vergleiche	
z.B.	Zum Beispiel	

## Indizes

<b><i>Index</i></b>	<b><i>Erläuterung</i></b>
BG	Biogas
el	elektrisch
FP	Fermenterprobe
In	Inokulum
min	Minimalwert
max	Maximalwert
opt	Optimalwert
oTM	organische Trockenmasse, als Index für Dimensionen der Masse
spez	spezifisch: bezogen auf die Masse
Sub	Substrat
TM	Trockenmasse, als Index für Dimensionen der Masse
w	Wasser

## 1. Einführung und Zielstellung

### 1.1. *Problemstellung*

Biomassekraftwerke und insbesondere Biogasanlagen (BGA) wurden in den bislang entwickelten Szenarien zur Umstellung der Energiesysteme hauptsächlich als Beitrag zur Grundlastsicherung angesehen. Es zeichnet sich jedoch derzeit die Tendenz ab, mit Biomasse auch Regelenergie zum Ausgleich des fluktuierenden Stromangebotes aus Wind- und Solarenergieanlagen bereitzustellen. Anders als bei anderen erneuerbaren Energien wie z.B. Wind- und Solarenergie ist aber eine Limitierung der für eine energetische Nutzung verfügbaren Biomasse bereits abzusehen. Zum einen, weil der Boden selbst als limitierende Ressource zu betrachten ist, zum anderen weil die Produktion von Nahrungsmitteln auf den verfügbaren Flächen absoluten Vorrang besitzt. Um die positiven Aspekte der energetischen Nutzung von Biomasse in BGA voll zum Tragen zu bringen, ist demzufolge eine maximale Ausnutzung der verfügbaren Biomasse notwendig. Dies setzt einen biologisch stabilen, sicheren und energetisch effizienten Betrieb des Biogasfermenters voraus. Hierfür ist neben vielen anderen Faktoren eine ausreichende Versorgung der Fermenterbiologie mit essentiellen Spurenelementen eine notwendige Voraussetzung.

Die Beschäftigung mit der Problematik der Spurenelementversorgung von landwirtschaftlichen BGA ist in Deutschland eng mit den gesetzlichen Regularien und Fördermaßnahmen verknüpft. Nach der ersten Novellierung des Gesetzes für den Vorrang erneuerbarer Energien (kurz: Erneuerbare-Energien-Gesetz, EEG) im Jahr 2004, begann man sich erstmals intensiver mit Fragen der Spurenelementversorgung von Biogasfermentern zu beschäftigen. Der Grund dafür war die Einführung eines sog. NaWaRo-Bonus, der eine zusätzliche Vergütung von 6 ct/kWh<sub>el</sub> vorsah, sofern als Substrate ausschließlich nachwachsende Rohstoffe eingesetzt werden. Dies führte dazu, dass der Betrieb einer Biogasanlage auch für Landwirtschaftsbetriebe ohne Tierhaltung wirtschaftlich interessant wurde. In den Folgejahren wurde eine große Anzahl von BGA errichtet, die für einen güllefreien Betrieb, ausschließlich auf Basis von Substraten pflanzlichen Ursprungs wie Maissilage, Grassilage, Roggen-Ganzpflanzensilage und ähnlichem konzipiert waren. Der Verzicht auf tierische Exkremeinte führte dazu, dass auch die für die Tierernährung essentiellen und in den Ausscheidungen enthaltenen Spurenelemente nicht mehr oder in nur sehr geringen Konzentrationen in den Fermenter gelangten. Aufgrund der sehr unterschiedlichen Ansprüche von Pflanzen und Tieren hinsichtlich der Spurenelementversorgung konnte dies nicht durch Substrate pflanzlichen Ursprungs kompensiert werden. Die sich in der Folge einstellenden Prozessstörungen wurden sehr schnell auf eine Fehl- oder Unterversorgung an Spurenelementen zurückgeführt und bewirkten eine verstärkte Forschungstätigkeit zu diesem Thema. Aufgrund der Tatsache, dass



der güllefreie Betrieb von landwirtschaftlichen BGA ein spezifisch deutsches Phänomen darstellte, fanden diese Forschungen hauptsächlich in Deutschland statt. In der Folge wurden durch verschiedene Hersteller Spurenelementpräparate, z.T. auch mit puffernder Wirkung und weiteren Wirkeffekten, entwickelt. [2]

Durch die Novellierung des EEG von 2009 wurde die güllefreie Vergärung weniger attraktiv, durch die Einführung eines Güllebonus‘ wurden sogar wieder Anreize zum Einsatz von Wirtschaftsdünger geschaffen. Es wurde jedoch im Zuge der Entwicklung erkannt, dass der Hochlastbetrieb von Biogasfermentern, also bei Raumbelastungen von mehr als  $6 \text{ kg}_{\text{öTM}} \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ , ohne eine ausreichende Versorgung mit essentiellen Spurenelementen nicht möglich ist.

Mit der Novellierung des EEG im Jahr 2012 wurde eine Tendenz eingeleitet, die erneut zu einer verstärkten Beschäftigung mit der Spurenelementproblematik führte. So wurde z.B. mit der Einführung der einsatzstoffbezogenen Vergütung die Vergärung von Reststoffen und Koppelprodukten der Lebensmittelverarbeitung, die bis dahin der Abfallvergärung vorbehalten waren, auch in landwirtschaftlichen BGA möglich. Da diese Substrate bei einigen Anlagen einen bedeutenden Teil des Einsatzstoffspektrums ausmachen, können auch hier leistungsmindernde Effekte durch einen Mangel an Spurenelementen auftreten, denen entsprechend zu begegnen ist.

Die Tendenz, zunehmend Rest- und Abfallstoffe sowie Biomassen im Sinne einer Kaskadennutzung in BGA energetisch zu nutzen, setzt sich derzeit fort. Insbesondere durch die jüngste Novellierung des EEG vom August 2014 wurden Bedingungen geschaffen, die einen wirtschaftlichen Betrieb von Biogasanlagen nahezu nur noch unter Einsatz von Rest- und Abfallstoffen ermöglichen. Dies erfordert zum einen, aufgrund der teilweise geringen spezifischen Biogaserträge dieser Stoffe, den Betrieb der Biogasfermenter bei höheren Raumbelastungen. Zum anderen bestehen teilweise hohe lokale Verfügbarkeiten einzelner Reststoffe, die in BGA energetisch nutzbar sind. Diese werden somit das Einsatzstoffspektrum deutlich dominieren, in einigen Fällen sogar eine Monovergärung attraktiv machen. In beiden Fällen stellt eine ausreichende Versorgung des Prozesses mit essentiellen Spurenelementen eine der grundlegenden Voraussetzungen für einen stabilen und effizienten Fermenterbetrieb dar. [3]

Die derzeitige Situation in Deutschland ist durch einen verbreiteten Einsatz von kommerziell erhältlichen Spurenelementpräparaten gekennzeichnet. [4] Konkretes Datenmaterial liegt nicht vor. Aus Betreibergesprächen und den verfügbaren Informationen der Anbieter kann jedoch gefolgert werden, dass selbst bei Anlagen mit einem hohen Gülleanteil am Substratspektrum ein regelmäßiger Einsatz von Spurenelementmischungen durchaus üblich ist. Eine optimale Dosierung bzw. eine optimale Zusammenstellung der Mischung ist dabei aus mehreren Gründen sinnvoll und erforderlich.

Aus der Sicht des Anlagenbetreibers stellt der Einsatz von Prozesshilfsstoffen einen Kostenfaktor dar, der aus ökonomischen Gründen zu minimieren ist. Der positive Effekt einer Prozessstabilisierung sollte also mit einem minimalen Einsatz an Hilfsstoffen erreicht werden.

Berücksichtigt man, dass die Gärreste von BGA entweder auf direktem Wege oder ggf. über Zwischenschritte nahezu ausnahmslos wieder auf die landwirtschaftlichen Flächen gelangen, dann ist eine Minimierung des Spurenelementeinsatzes auch aus Gründen des Umwelt- und Naturschutzes zwingend erforderlich. Viele der für den Prozess der Methangärung essentiellen Spurenelemente zählen zur Gruppe der Schwermetalle und sind damit in höheren Konzentrationen potenziell toxisch für Tiere und Pflanzen. Eine Akkumulation bis zur Toxizitätsgrenze im Boden, im Grundwasser, in Pflanzen oder weiteren Gliedern der Nahrungskette muss mit Sicherheit ausgeschlossen werden können.

Schließlich kann auch eine Überdosierung bei einigen Spurenelementen den gewünschten positiven Effekt ins Negative verkehren und Störungen in der Prozessbiologie von Biogasfermentern bewirken. [5]

## **1.2. Ziele der Arbeit**

Ein optimaler Einsatz von Spurenelementpräparaten unter Vermeidung von negativen Auswirkungen setzt (unter anderem) die möglichst exakte Kenntnis von Bedarfsuntergrenzen für die einzelnen essentiellen Spurenelemente voraus. Im Rahmen dieser Arbeit sollen die in Biogasfermentern anzustrebenden Zielkonzentrationen als Untergrenzen für die wichtigsten relevanten Spurenelemente ermittelt werden.

Ergebnisse, die mit Ein-Komponenten-Substraten oder an Reinkulturen gewonnen wurden, belegen die Bedeutung der jeweils untersuchten Spurenelemente oder die Folgen eines Fehlens dieser (siehe Kapitel 2.3), erlauben jedoch in vielen Fällen keine direkten Rückschlüsse auf notwendige Mindestkonzentrationen in der Praxis. Die in dieser Arbeit angewandte Methodik stützt sich daher auf die Bewertung von Praxisanlagen. Mit einer in der Arbeit entwickelten Methode wird die biologische Leistungsfähigkeit der Fermenterbiologie quantifiziert und mit der Spurenelementversorgung des jeweiligen Fermenters in Korrelation gebracht. Dazu war zunächst eine geeignete Untersuchungsmethode zu entwickeln, mit der sich die Leistungsfähigkeit der Fermenterbiologie von Praxisanlagen zeitnah beurteilen lässt. Die in der Arbeit entwickelten Methoden zur Untersuchung und Bewertung der Fermenterbiologie führen zur Ableitung von Ziel- oder Richtkonzentrationen für die untersuchten Spurenelemente und basieren auf folgenden Thesen:

1. Es existiert ein nachweisbarer Zusammenhang zwischen der Leistungsfähigkeit der Fermenterbiologie (ausgedrückt als Substrat-Umsatzleistung) und den im Fermenter messbaren Spurenelementkonzentrationen.

Diese Aussage ist bereits experimentell hinreichend belegt. [6], [7], [8], [9] Dennoch bleiben bei näherer Betrachtung der Problematik einige Fragen offen. Insbesondere die verfügbaren Methoden zur Spurenelement-Analytik stellen einen Schwachpunkt dar, da sie üblicherweise einen Vollaufschluss der Probe voraussetzen. Damit werden die gesamten in der Probe enthaltenen Spurenelemente unabhängig von ihrer Bindungsform analytisch erfasst. Dies führt im Zweifelsfall zu einer Überbewertung der Spurenelementversorgung, da z.B. die in Sulfiten stark gebundenen Metallionen zwar analytisch nachgewiesen werden, für den Stoffwechsel der Mikroorganismen jedoch nicht zur Verfügung stehen. Erste Ansätze zur Verfeinerung der analytischen Methoden und zur differenzierten Beurteilung der Bioverfügbarkeit sind bereits veröffentlicht, [10] aber noch nicht in der Laborpraxis etabliert.

2. Die biologische Aktivität der gesamten Abbaukette lässt sich durch eine zeitlich hoch aufgelöste Messung der Gasbildung aus einem standardisierten Substrat unter genormten Randbedingungen quantifizieren.

Dies bedeutet, dass die Kinetik des Substratumsatzes durch die Kinetik der Biogasbildung abgebildet werden kann.

Da die gesamte anaerobe Abbaukette sehr empfindlich auf die Anreicherung von Intermediaten reagiert, kommt dem verwendeten Substrat eine entscheidende Bedeutung zu. Veröffentlichte Untersuchungen verwenden häufig selektive Substrate wie Acetat oder Propionat, um gezielt die Abbauleistung einzelner Mikroorganismengruppen zu untersuchen [11], oder es werden einfach abbaubare Verbindungen wie Glucose verwendet. [12] Auch wird beispielsweise in der VDI-Richtlinie 4630 bei der Durchführung von Biogasertragstests ein Referenzansatz mit mikrokristalliner Zellulose vorgeschrieben, um eventuell aus dem Inokulum resultierende Hemmeffekte erkennen zu können. [13] Es ist weiterhin zu erwarten, dass ein Substrat das leicht abbaubar und vollständig für die an der anaeroben Methanbildung beteiligten Mikroorganismen verfügbar ist, von jeder gut ausgebildeten Fermenterbiologie unter identischen Randbedingungen nahezu gleich gut abgebaut werden kann. Der Substratabbau und insbesondere die Kinetik des Abbaus sollten dabei unabhängig von der konkreten Ausprägung der Biozönose im jeweils untersuchten Fermenter sein. Diese Annahme und die sich daraus ergebenden Konsequenzen werden im Kapitel 3.2 eingehend diskutiert.

3. Durch Verwendung selektiver Substrate ist es möglich, die Abbauleistung einzelner Mikroorganismengruppen bzw. die einzelnen Phasen der Methangärung getrennt zu untersuchen.

Dies ist möglich, da die Mikroorganismen in den einzelnen Phasen der Methangärung (vgl. Kapitel 2.2) die Stoffwechselprodukte der jeweils vorangegangenen Phasen als Ausgangsstoffe nutzen. So kann z.B. durch die Zugabe von Acetat gezielt die Stoffwechselaktivität einer einzelnen am Abbauprozess beteiligten Gruppe (der Acetat verwertenden Methanbildner) untersucht werden. [11]

4. Aus der Messung der biologischen Aktivität einer großen Anzahl von Fermenterproben und den gefundenen Spurenelementkonzentrationen lassen sich statistisch gesicherte Aussagen zu Zielkonzentrationen ableiten.

Der häufig verwendete Begriff „Bedarfwert“ bezieht sich in seiner Bedeutung auf die Mikroorganismen oder Mikrobiozöosen. Im eigentlichen Sinn beschreibt ein Bedarfwert also den Anspruch eines Organismus bezüglich der Versorgung mit einem Nährstoff, in diesem Falle einem Spurenelement. Dabei wird stillschweigend unterstellt, dass der jeweilige Nährstoff in einer für den Organismus verwertbaren Form vorliegt. Wie später noch ausführlich diskutiert wird, ist dies jedoch in Biogasfermentern besonders bei Spurenelementen in den meisten Fällen nicht zutreffend. Der methodische Ansatz dieser Arbeit ist nicht direkt auf die Untersuchung der beteiligten Mikroorganismen gerichtet, sondern auf die Untersuchung des Fermenterinhalts als Ganzes. Es sollen also nicht Bedarfwerte, sondern die in einem Biogasfermenter einzustellenden Ziel- oder Richtkonzentrationen für die einzelnen Spurenelemente ermittelt werden. Die Verteilung in bioverfügbare und nicht bioverfügbare Anteile wird dabei als im Mittel etwa gleich vorausgesetzt.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen und Ergebnisse beziehen sich ausschließlich auf Biogasreaktoren, die im mesophilen Bereich, also bei einer Fermentertemperatur zwischen 37 und 42 °C, betrieben werden. Eine Untersuchung von thermophil betriebenen Biogasfermentern ist im Rahmen dieser Arbeit nicht erfolgt. Der Grund dafür ist im Wesentlichen die gegenüber der mesophilen Betriebsweise deutlich geringere Anzahl von thermophilen Biogasanlagen. Die Bedeutung der Ergebnisse für die Betriebspraxis von Biogasanlagen ist also geringer. Des Weiteren wäre der angestrebte experimentelle Umfang nur mit einem unverhältnismäßig großen Transportaufwand möglich gewesen. Bedingt durch die höheren Umsetzungsraten im thermophilen Temperaturbereich und durch die z.T. anders zusammengesetzte Mikrobiologie kann jedoch davon ausgegangen werden, dass sich die Anforderungen hinsichtlich des Bedarfs an essentiellen Spurenelementen bei thermophil betriebenen Biogasfermentern verschieben, in der Regel erhöhen. [12]

## 2. Grundlagen und Stand der Forschung

### 2.1. *Funktion von Spurenelementen im Stoffwechsel der Organismen*

Als Spurenelemente werden üblicherweise chemische Elemente bezeichnet, die im lebenden Organismus in nur sehr geringen Konzentrationen auftreten. Die Bezeichnungen „essentielle Spurenelemente“ oder „Mikronährstoffe“ werden synonym verwendet, wenn diese für das Überleben oder die Gesundheit des Organismus essentiell sind, ein vollständiges Fehlen der betreffenden Elemente also zu Funktionsstörungen im Stoffwechsel der betreffenden Organismen führt. Dabei werden als Spurenelemente im engeren Sinne hauptsächlich chemische Elemente aus der Gruppe der Metalle oder Schwermetalle mit Ordnungszahlen  $>20$  verstanden. [14], [15] Eine einheitliche Definition oder klare begriffliche Einschränkung, um die Spurenelemente von den so genannten Massenelementen abzugrenzen, existiert jedoch bislang nicht. So gibt z.B. KIRCHGESSNER [16] für diese Abgrenzung eine (mehr oder weniger willkürlich gesetzte) Konzentration von  $\leq 50$  mg/kg Körpermasse an. Andererseits wird Eisen in vielen Arbeiten zum Thema zu den essentiellen Spurenelementen gezählt, obwohl es häufig in weitaus höheren Konzentrationen in Organismen auftreten kann. Im Kontext dieser Arbeit wird durchgängig der Begriff „essentielle Spurenelemente“ verwendet, und zwar wenn bezüglich der betreffenden chemischen Elemente die folgenden Aussagen zutreffen:

- Die im Normalfall im Biogasfermenter anzutreffenden Konzentrationen sind klein, verglichen mit den Hauptnährstoffen P, N, S, Ca, Na, Mg, ein vollständiges Fehlen führt aber nachweislich zu Störungen oder Instabilitäten im Biogasprozess. Dies trifft z.B. für Se, Co oder Ni zu.
- Die Konzentrationen können zwar annähernd gleiche Größenordnungen wie die Konzentrationen der Hauptnährstoffe erreichen, die Wirkmechanismen des betreffenden Elements im Metabolismus des anaeroben Abbaus legen jedoch eine Einordnung in die Gruppe der Spurenelemente nahe, wie z.B. im Fall von Fe, Cu oder Zn.

Die als essentiell identifizierten Spurenelemente erfüllen sehr unterschiedliche Funktionen im Stoffwechsel der Organismen. So sind beispielsweise Cu und Fe häufig die reaktiven Zentren von Transport- und Speicherproteinen, von denen das für den Sauerstofftransport bei höheren Lebewesen bedeutsame Hämoglobin wohl das bekannteste Beispiel darstellt. Des Weiteren sind Metallatome wie Zn, Ca, Mg wichtige Bausteine von strukturbildenden Proteinen, die in festen Strukturen eine Stützfunktion beim Aufbau der Organismen übernehmen, wie z.B. beim Knochenbau der Säugetiere. Die bedeutendste Funktion jedoch üben Spurenelemente als reaktive Zentren von Enzymen aus. Nahezu alle Stoffwechselvorgänge laufen als eine Kaskade enzymatisch katalysierter Einzelreaktionen ab. Dies trifft sowohl für höhere Lebewesen zu als auch speziell

für die Stoffwechselvorgänge der an der Methangärung beteiligten Mikroorganismen. Eine nähere Betrachtung dieser Stoffwechselvorgänge soll im Kapitel 2.2 die Bedeutung der enzymatischen Reaktionen verdeutlichen. Die Rolle der an der Methangärung wesentlich beteiligten Spurenelemente wird anschließend im Kapitel 2.3 erörtert.

## **2.2. Biochemie des anaeroben Abbaus von Biomasse**

Die biochemischen Mechanismen des anaeroben Abbaus von Biomasse zu Methan sind sehr komplex und in ihrer Gesamtheit bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Dies hat in den letzten Jahrzehnten zu einer intensiven Forschungstätigkeit mit einer immer tieferen Spezialisierung der Untersuchungen geführt. Entsprechend groß ist der Umfang an Publikationen zum Thema. Im Folgenden soll daher der aktuelle Stand des Wissens mit Beschränkung auf den für die Arbeit relevanten Themenkreis dargestellt werden.

Der anaerobe Abbau von Biomasse zu Methan und Kohlenstoffdioxid wurde bereits früh wissenschaftlich untersucht. Standardwerke wie z.B. von BUSWELL [17] sind in ihren grundlegenden Aussagen noch immer akzeptiert und werden bis heute zitiert. Insbesondere das Vier-Stufen-Modell, das nach den Arbeiten von BRYANT [18] ausgearbeitet wurde, hat sich zur Beschreibung der grundlegenden Vorgänge des anaeroben Abbaus organischer Stoffe bewährt. [19] Eine mehr oder weniger tief gehende Darstellung dieses Modells findet sich in jeder Arbeit, die sich mit dem Prozess der Methangärung auseinandersetzt. Dennoch sollen die wesentlichen Grundzüge hier noch einmal erläutert werden, insbesondere um die Rolle der Spurenelemente bei den einzelnen Teilreaktionen zu verdeutlichen und den Zusammenhang mit den Darlegungen des folgenden Kapitels herzustellen.

Der anaerobe Abbau organischer Masse zu den Endprodukten Methan und Kohlenstoffdioxid erfordert zunächst eine Spaltung der meist noch sehr großen komplexen organischen Moleküle in kleinere Einheiten. Dies geschieht im Wesentlichen in der ersten Stufe, der **Hydrolyse**. Polymere Kohlehydrate (Zucker, Hemizellulose, Zellulose, Pektin) werden in dieser Stufe zu monomeren Einheiten, vor allem Monosaccharide wie Glucose, abgebaut. Dies geschieht mit Hilfe von extrazellulär wirksamen Enzymen. So bewirkt beispielsweise  $\alpha$ -Amylase die Spaltung des Stärkebestandteils Amylose zu Glucose. [20]

Eiweiße (Proteine) werden hydrolytisch zu Aminosäuren und Peptiden gespalten. Der hydrolytische Abbau von Eiweißen verläuft wesentlich komplexer als bei Kohlehydraten. Reaktionsmodelle wie das Anaerobic Digestion Model No.1 (ADM1) berücksichtigen die Bildung von bis zu 20 verschiedenen Aminosäuren. [21] Auch die Proteinhydrolyse ist enzymatisch katalysiert und erfolgt mittels extrazellulärer Enzyme, im wesentlichen Proteasen und Peptidasen. [22]

Fette werden während der Hydrolysephase enzymatisch mit Hilfe von Lipasen und Phospholipasen in kleinere Einheiten zerlegt. Die Endprodukte der Hydrolyse von Fetten sind längerkettige Fettsäuren (long chain fatty acids, LCFA) und Glycerin.

Die an der Hydrolyse und den genannten hydrolytischen Reaktionen beteiligten Enzyme werden nach der Enzyme Commission (EC) Nomenklatur unter dem Begriff Hydrolasen unter der Nummer EC 3 geführt. [23]

In der **Acidogenese** oder Versäuerungsphase werden die bei der Hydrolyse gebildeten Monomere in kurzkettige Fettsäuren, Alkohole, Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff gespalten.

Die Acidogenese wurde lange Zeit als eigenständiger Prozessschritt betrachtet. Insbesondere bei landwirtschaftlichen Biogasanlagen, die vorwiegend kohlehydratreiche Substrate vergären, ist dieser Schritt jedoch nicht klar von der Hydrolyse abgrenzbar, da die beteiligten Mikroorganismen in enger räumlicher Nähe siedeln und beide Phasen zeitlich parallel ablaufen können. So wird beispielsweise die aus der Hydrolyse von Stärke entstehende Glucose durch acidogene Mikroorganismen sofort weiter zu organischen Säuren bzw. zu Acetat abgebaut. [20] In der Literatur finden sich keine Hinweise darauf, dass die bei der Acidogenese wirksamen Enzyme aktive Metallzentren enthalten. Es wird allgemein darauf verwiesen, dass während dieser Phase des Abbaus keine besonderen Anforderungen hinsichtlich der Spurenelementversorgung bestehen. [20], [24]

Beim Abbau eiweißreicher Substrate oder veresterter Öle entstehen während der Acidogenese auch die toxischen Produkte Schwefelwasserstoff ( $\text{H}_2\text{S}$ ) und Ammoniak ( $\text{NH}_3$ ).

Die beiden letzten Stufen, die **Acetogenese** (Acetatbildung) sowie die **Methanogenese**, in welcher das eigentliche Zielprodukt Methan gebildet wird, können ebenfalls nicht voneinander getrennt betrachtet werden. Häufig ist eine enge räumliche Verbindung der an den Prozessschritten beteiligten Mikroorganismen in Form von so genannten Bioflocken anzutreffen. Diese enge räumliche Verbindung resultiert aus der gegenseitigen Abhängigkeit sowohl bezüglich der verwertbaren Substrate als auch der Verwertung der Stoffwechselprodukte.

Die Acetogenese wird von syntrophen Bakterien betrieben, welche die Stoffwechselprodukte der Acidogenese, wie längerkettige oder verzweigte Fettsäuren, weiter zu Acetat, Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid abbauen. Dieser Reaktionsschritt ist insofern von Bedeutung, als dass eine Akkumulation dieser Zwischenprodukte, insbesondere der langkettigen Fettsäuren, zu einer deutlichen Prozesshemmung führen kann. [25] Unter Standardbedingungen (25 °C, 1013 kPa, pH 7) ist die freie Reaktionsenthalpie der meisten dieser Reaktionen

jedoch positiv. Die Reaktionen können also nur unter Aufwendung zusätzlicher Energie ablaufen. Als Beispiel sei an dieser Stelle der Abbau von Propionsäure genannt, bei deren Spaltung ein zusätzlicher Energieaufwand von  $76 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  erforderlich ist. (Abbildung 1)

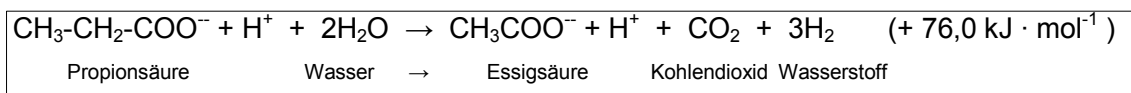


Abbildung 1: Reaktion des Propionsäureabbaus und Energiebilanz unter Standardbedingungen nach [26]

Nur durch die permanente Entfernung des Wasserstoffs durch methanbildende Mikroorganismen können die Reaktionsbedingungen soweit verschoben werden, dass die Reaktion unter Energiefreisetzung abläuft und das Reaktionsgleichgewicht auf die rechte Seite verschoben wird. Der Vorgang der schnellen und möglichst vollständigen Verwertung des freien Wasserstoffs wird auch als *interspecies hydrogen transfer* bezeichnet und bildet eine Grundvoraussetzung für die Reaktionen der Phase der Acetogenese. Die Bildung von Methan erfolgt in Biogasanlagen nahezu ausschließlich durch Mikroorganismen der eigenständigen Domäne *Archea*, und zwar im Wesentlichen auf den in Abbildung 2 dargestellten Reaktionswegen.

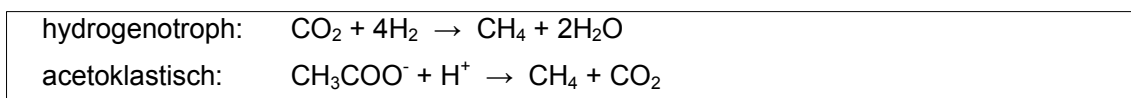


Abbildung 2: Die wichtigsten Reaktionswege der Methanogenese

Die methanbildenden Mikroorganismen, und hier wiederum die hydrogenotrophen Stämme, spielen also an dieser Stelle eine Schlüsselrolle in der gesamten Abbaukette. Mikrobiologische Untersuchungen von Fermenterinhalt landwirtschaftlicher Biogasanlagen haben ein deutliches Überwiegen der hydrogenotrophen Stämme konstatiert. [20]

Umgekehrt sind methanogene Archaeen ausgesprochene Substratspezialisten und damit auf die Stoffwechselprodukte der Acetogenese angewiesen. Die Sicherstellung optimaler Lebensbedingungen sowohl für die syntrophen acetogenen Bakterien als auch für die methanogenen Archaeen ist demnach neben der eingangs erwähnten räumlichen Nähe von entscheidender Bedeutung für die Prozessstabilität bei der technischen Nutzung der Methangärung in Biogasanlagen. Der – verglichen mit aeroben Abbauprozessen – sehr geringe Energiegewinn (vgl. Abbildung 1) macht bereits deutlich, dass die Mehrzahl der Stoffwechselreaktionen der Methanogenese nur enzymatisch katalysiert ablaufen kann. [27] Demzufolge sind auch die Ansprüche der Methanogenese hinsichtlich der Spurenelementversorgung, verglichen mit den anderen Stufen, hoch. Das betrifft nicht unbedingt die Höhe der erforderlichen Mindestkonzentration, sondern die Vielzahl der beteiligten Spurenelemente und ihrer Kombinationen sowie die drastischen Auswirkungen einer Unterversorgung mit diesen. Für die



methanogenen Mikroorganismen sind mindestens die Elemente Ni, Fe, Co, Se, Zn, Mo, Mn, W, B und V als essentiell identifiziert worden. [28], [29], [30], [31] In einer umfassenden Untersuchung konnte gezeigt werden, dass eine Zugabe von Se, W und Co deutlich positive Auswirkungen auf das Wachstum von Mikroorganismen des Typs *Archaea* zeigt, während für andere Mikroorganismengruppen keine Korrelation zur Zugabe dieser Spurenelemente gefunden wurde. [32]

Neben der Konzentration der essentiellen Spurenelemente wirken sich auch deren Bioverfügbarkeit sowie weitere Prozessparameter wie Temperatur, pH-Wert und Redox-Potenzial auf die Enzymaktivität und somit auf ihre Wirksamkeit im Prozess aus.

### **2.3. Bedeutung einzelner Spurenelemente für den Prozess der Methangärung**

Zum Einfluss einzelner Spurenelemente auf die Mikrobiologie der Methangärung wurden viele, zum Teil sehr umfangreiche Untersuchungen durchgeführt und publiziert. Aufgrund der historischen Entwicklung der Anaerobtechnik aus der Abwasserbehandlung heraus befassen sich viele dieser Arbeiten mit der Optimierung der Klärschlammfäulung. [33], [34], [35] Dabei waren sowohl die Definition von Bedarfsuntergrenzen (bei essentiellen Spurenelementen) als auch die Untersuchung von hemmenden Effekten (bei toxischen Schwermetallen) Gegenstand der Forschung. Erst in den letzten Jahren finden sich auch vermehrt Arbeiten, die sich mit der Spurenelementproblematik bei Vergärung organischer Abfälle und nachwachsender Rohstoffe befassen. Aufgrund der im Kapitel 2.2 dargestellten Komplexität der gesamten Abbaukette beschränkten sich diese Untersuchungen jedoch häufig auf einzelne Reaktionsschritte, den Metabolismus einzelner Mikroorganismenstämme oder den Abbau spezieller Substrate. [36], [12] Die Notwendigkeit der Spurenelementzugabe bei der Monovergärung von Abfällen ist in einer Reihe von Arbeiten dokumentiert, ohne dass jedoch konkrete Bedarfsuntergrenzen oder Zielkonzentrationen angegeben werden. [37], [38], [39], [40] Eine Zusammenfassung der Wirkmechanismen, sowohl der stimulierenden als auch der inhibierenden Effekte, findet sich bei OLESZKIEWICZ. [30] Für einige der im Kapitel 2.2 aufgeführten essentiellen Spurenelemente ist der Wirkmechanismus bislang nicht vollständig aufgeklärt.

Ein überwiegender oder ausschließlicher Einsatz von NaWaRo zur Biogasproduktion stellt besondere Anforderungen an die Spurenelementversorgung. Dies betrifft sowohl die Zielwerte für die Konzentrationen der einzelnen Spurenelemente als auch die Frage, welche Spurenelemente überhaupt von Relevanz sind. [41] Eine derartige Betriebsweise ist allerdings aufgrund der besonderen durch das EEG geschaffenen Bedingungen hauptsächlich in Deutschland anzutreffen. Demzufolge sind Arbeiten, die sich mit diesen speziellen

Verhältnissen beschäftigen, in der Mehrzahl in Deutschland durchgeführt und publiziert worden.

Ein direkter Vergleich der Literaturdaten wird durch die Verwendung unterschiedlicher Bezugsgrößen erschwert. So findet sich in Arbeiten, die sich hauptsächlich mit der Klärschlammfäulung befassen, die Angabe der Spurenelementzugabe bezogen auf die Masse des abgebauten CSB in  $[\text{mg}/\text{kg}_{\text{CSB}}]$ . Klassische mikrobiologische Untersuchungen mit Fokussierung auf einzelne Mikroorganismenstämme geben üblicherweise die Konzentration des betreffenden Spurenelements im Nährmedium z.B. in  $\text{mg}/\text{L}$  oder  $\mu\text{mol}/\text{L}$  an, während bei eher praxisorientierten Ansätzen die Angabe der Spurenelementkonzentration im Fermenterschläm in  $\text{mg}/\text{kg}$  oder  $\text{mg}/\text{kg}_{\text{TM}}$  üblich ist. [28] Sofern eine Umrechnung auf eine einheitliche Bezugsbasis wegen fehlender weiterer Angaben nicht möglich ist, werden in der Zusammenfassung in Tabelle 1 die Angaben in der jeweils publizierten Einheit angegeben.

Viele experimentelle Daten zur stimulierenden oder hemmenden Wirkung von Spurenelementen wurden bereits in Übersichtsbeiträgen, auf die hier zurückgegriffen wird, zusammengefasst und publiziert. [42], [43], [28], [20], [30], [44] Detaillierte Informationen wurden außerdem aus der frei zugänglichen Online-Enzym-Datenbank BRENDA der Universität Braunschweig entnommen. [23] Diese enthält umfangreiche Angaben zu den einzelnen Enzymen, den katalysierten Reaktionen und zu den Organismen, welche zur Bildung dieser Enzyme befähigt sind. Die folgende Auflistung soll den derzeitigen Stand der Kenntnis bezüglich der für die Methangärung bedeutsamsten Spurenelemente zusammenfassen.

### **Nickel**

Die Bedeutung von Ni für die Methanogenese ist gut erforscht und belegt. Ni fungiert als Zentralatom des Cofaktors F430 (Enzym-Nomenklatur EC 1.12.98.1). Dieses Enzym spielt im Stoffwechsel verschiedener Stämme der Gruppe *Methanobacter* eine entscheidende Rolle, wo es die Aufnahme von molekularem  $\text{H}_2$  ermöglicht, indem es in eine reduzierte Form überführt wird. In der anaeroben Abbaukette ist es außerdem Bestandteil des Enzyms Carbon-Monoxide-Dehydrogenase (CODH), ein Enzym das Stämme der Gruppe Methanosarcina zur Oxidation von CO-Gruppen zu  $\text{CO}_2$  befähigt, eine Reaktion, die mit großem Energiegewinn verbunden ist. Auch im Stoffwechsel der acetoklastischen Archaeen scheint Ni eine Rolle zu spielen, indem es bei der Spaltung von Acetat durch Methylreduktasen beteiligt ist. [45] Ein Ni-Mangel stellt sich offenbar erst nach relativ langer Zeit der Unterversorgung ein, da die Mikroorganismen Ni aufnehmen und speichern können, wenn ein Überangebot vorliegt. [46] Im Experiment konnte z.T. erst nach langen Versuchszeiträumen von 140 Tagen eine Prozesshemmung beobachtet werden, die auf einen Ni-Mangel zurückzuführen war. [43]

Die generell stimulierende Wirkung von Ni konnte auch bei Versuchen mit Belastung der Mikroorganismen durch hohe Salzgehalte nachgewiesen werden. Bei Chlorid-Konzentrationen von  $20...50 \text{ gL}^{-1} \text{ Cl}^-$  konnte in Anwesenheit von Ni in Form von  $\text{NiCl}_2$   $0,1 \text{ mgL}^{-1}$  keine Erhöhung der Methanausbeute, jedoch ein deutlich beschleunigter Substratumsatz beobachtet werden. [47]

Die veröffentlichten Daten zu Mindestbedarfen beruhen hauptsächlich auf experimentellen Untersuchungen von Reinkulturen oder Mischkulturen aus Abwässern unter Verwendung von Glucose oder Acetat als Modellsubstrat. [46], [5] Unter Verwendung von Glucose als Monosubstrat wurde so z.B. unter mesophilen Temperaturverhältnissen eine Mindestkonzentration von  $0,061 \text{ mg}_{\text{Ni}}/\text{L}$  ermittelt. [12] Ein Vergleich tatsächlicher Ni-Konzentrationen in 10 Praxis-Biogasfermentern zeigte demgegenüber erheblich höhere Konzentrationen mit großen Spannweiten von  $0,5...3,6 \text{ mg}_{\text{Ni}}/\text{kg}$  Fermenterinhalt. [28] Die Obergrenze, ab der Ni hemmend auf den anaeroben Abbauprozess wirkt, wird mit  $81...440 \text{ mg/l}$  angegeben. [43]

An kontinuierlich betriebenen Laborfermentern mit hauptsächlich NaWaRo als Substrat wurden Versuche mit einer sukzessiven Spurenelementverarmung durchgeführt. Aus diesen Versuchen wurde für Ni ein Mindestbedarfswert von  $3,0 \text{ mg/kg}_{\text{TM}}$  abgeleitet. [2] In anderen Quellen wird der Optimalbereich mit  $4,0...10 \text{ mg/kg}_{\text{TM}}$  angegeben. [41] Aufgrund der Versuchsanordnung und der Substratzusammensetzung lassen sich diese experimentellen Daten am ehesten auf den Betrieb von großtechnischen Biogasanlagen in Deutschland anwenden.

### Eisen

Eisen fungiert bei biochemischen Reaktionen generell als Elektronenakzeptor. Im Prozess der Methanogenese ist es von Bedeutung, weil Fe neben Nickel ein Bestandteil von CODH ist.

Die stimulierende Wirkung von Fe auf die Biogasproduktivität kann auch sekundär sein und ist in diesem Fall auf die hohe Affinität zu Schwefel zurückzuführen. Schwefelwasserstoff ( $\text{H}_2\text{S}$ ) entsteht als Zwischenprodukt während der Acidogenese und wirkt in gelöster Form als Zellgift. Durch die Reaktion mit Eisen zu schwer löslichem  $\text{FeS}$  wird der Schwefel eingebunden und eine Intoxikation durch  $\text{H}_2\text{S}$  verhindert. Gleichzeitig wird durch diesen Effekt die Konzentration freier  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen und damit die Bioverfügbarkeit vermindert. Dies ist unter anderem die Ursache dafür, dass durchaus Fe-Mangelerscheinungen in Biogasfermentern beobachtet wurden, obwohl Eisenlegierungen in Form von Stählen und Edelstählen fast überall als Konstruktionsmaterial anzutreffen sind. Daher konnte in Praxisversuchen eine Erhöhung der Biogasausbeute durch eine zusätzliche Dosierung von bioverfügbarem Fe nachgewiesen werden.

Die als optimal angegebenen Konzentrationen für Fe schwanken zwischen 50 und 200 mg/l. [42] Für NaWaRo-Biogasanlagen werden 1.200...3.000 mg/kg<sub>TM</sub> empfohlen. [2], [41] Die tatsächlich in Biogasfermentern gefundenen Werte liegen z.T. um eine Größenordnung höher. [28]

### **Mangan**

Mn ist ein wichtiger Kofaktor in der Reaktionskette verschiedener Enzyme. Obwohl Mn selbst nicht katalytisch wirkt, werden einige Enzyme, vor allem Kinasen und Phosphotransferasen, erst durch die Anwesenheit von Mn aktiviert oder stabilisiert. [48] Mangan kann als Mn<sup>4+</sup> in hoch oxidierten Form vorliegen und fungiert so in der anaeroben Energiegewinnung wie Eisen als hochwirksamer Elektronenakzeptor. [28]

Die Optimalwerte für Mn werden in der Literatur mit 100...300 mg/kg<sub>TM</sub> angegeben.

### **Molybdän**

Ein Enzym, das den letzten Reaktionsschritt der Oxidation von Methanol zu CO<sub>2</sub> katalysiert, ist *Formylmethanofuran Dehydrogenase*. Es enthält Mo als reaktives Zentrum und wurde in Stämmen von *Methanobacter* und *Methanosarcina* nachgewiesen. Molybdän spielt auch im Stoffwechsel verschiedener Arten von *Clostridium*, die unter anderem bereits an der Acidogenese beteiligt sind, eine zentrale Rolle. [23] Damit ist Mo ein Spurenelement, das nicht nur während der Methanogenese, sondern auch in vorhergehenden Phasen des anaeroben Abbaus essentiell ist.

Versuche mit *M. thermoautotrophicum* haben gezeigt, dass Mo als essentiell für das Wachstum mindestens dieser methanogenen Mikroorganismen anzusehen ist. Ein konkreter Mindestbedarf wurde nicht aus den Versuchen abgeleitet, jedoch rechnerisch ein Bedarf von 20 nmol Mo für den Aufbau von 1 g<sub>TM</sub> Zellsubstanz ermittelt. [49] Der Bedarf in NaWaRo-Biogasanlagen wird in [41] mit 2,6...8,0 mg/kg<sub>TM</sub> angegeben, in anderen Quellen werden 1,0...6,0 mg/kg<sub>TM</sub> als Optimalbereich beschrieben. [2]

### **Cobalt**

Co ist Zentralatom in mehreren Koenzymen. Das Koenzym B12 (Propandiol Dehydratase) spielt in der anaeroben Abbaukette im Stoffwechsel der *Acetobacteria* eine Rolle, indem es den Abbau von 1,2 Propandiol zu Acetat katalysiert. Des Weiteren ist Co als Bestandteil von Coenzym M relevant, in dem neben Co auch Zn aktiv ist. Coenzym M Methyltransferase spielt beim Übertragen von Methylgruppen und damit beim Abbau längerer organischer Säuren eine wichtige Rolle. [23] Ein Co-Mangel kann sich demzufolge in Form einer verlangsamten Acetogenese und der Akkumulation von organischen Säuren und ihrer Isomere auswirken. Auch im Stoffwechsel methanogener Archaeen ist Co

essentiell. In Langzeitexperimenten zur Monovergärung von Maissilage hat sich die Versorgung mit Co als der am deutlichsten limitierende Faktor erwiesen. [50] Bei Untersuchungen an dem acetatverwertenden Organismus *Methanosarcina barkeri* wurde die Abhängigkeit des Stoffwechsels von der Aktivität des Coenzym M nachgewiesen. [45]

Bei Batch-Versuchen mit einem Modellsubstrat, das frei von Co war, konnte eine um 15 % verminderte Methanausbeute gegenüber der mit Co versorgten Variante gemessen werden. [51] In der gleichen Studie wurde ein Gehalt von  $2 \mu\text{mol L}^{-1}$  Co als optimale Konzentration im Nährmedium gefunden. Die empfohlenen Konzentrationen in Biogasfermentern liegen zwischen 0,4 und 10 mg/kg<sub>TM</sub>. [52]

### Selen

Se tritt wie Fe und Mn in vielen biochemischen Prozessen als Elektronenakzeptor auf. Als essentielles Spurenelement ist Se Bestandteil von Dehydrogenasen, die im Stoffwechsel von *Methanococcus* und *Methanopyrus* eine Rolle spielen. Die durch diese Enzyme katalysierten Reaktionen sind beispielsweise die Oxidation von Propionsäure, Buttersäure aber auch von Methanol zu CO<sub>2</sub>. Einige Mikroorganismen sind in der Lage, in bestimmten Enzymen Ni als Zentralatom durch Se zu ersetzen. [53]

Für den Prozess der Methangärung wurde Se auch als Inhibitor identifiziert, da schon bei vergleichsweise geringen Konzentrationen Hemmeffekte auf methanogene Mikroorganismen nachgewiesen wurden. Bei Versuchen mit Klärschlamm aus der Anaerobstufe einer industriellen Kläranlage wurde bereits bei Konzentrationen von  $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  (entspricht 7,9 mg/L) eine signifikante Hemmung der Methanbildung beobachtet. [54] Die analytische Nachweisbarkeit von Se ist jedoch stark abhängig von der vorliegenden Bindungsform. Gerade in den betrachteten niedrigen Konzentrationsbereichen ist die Bestimmung mit vergleichsweise großen Messunsicherheiten verbunden. [55]

Des Weiteren spielt Se im Stoffwechsel von Sulfat reduzierenden Mikroorganismen wie *Desulfovibro* eine wichtige Rolle [56] und kann somit indirekt zur Stabilisierung des Gesamtprozesses der Methangärung beitragen, indem durch *Desulfovibro* das toxische Zwischenprodukt Schwefelwasserstoff effektiv in elementaren Schwefel reduziert wird.

Hinsichtlich der empfohlenen Konzentrationen und Bedarfswerte ist bei den Literaturquellen eine erhebliche Spannweite zu verzeichnen. Während Se für die anaerobe Klärschlammbehandlung als von untergeordneter Bedeutung eingestuft wird [30], wird für NaWaRo-Biogasanlagen in [41] ein Bereich von 0,4...2,0 mg/kg<sub>TM</sub> als optimal angegeben.

## **Zink**

Wie auch Ni ist Zn an vielen grundlegenden biochemischen Prozessen beteiligt. Als Kofaktor der RNA- und DNA-Polymerase ist Zn generell für das Zellwachstum von Bedeutung. [28] Im anaeroben Bereich ist Zn für den Stoffwechsel sowohl der acetoklastischen als auch der hydrogenotrophen Methanbildner als essentielles Spurenelement identifiziert worden. Wie bereits erwähnt, spielt Zn neben Co beim Aufbau von Coenzym M und damit bei der Abspaltung oder Übertragung von Methylgruppen eine Rolle. Für die hydrogenotrophe Methanogenese aus H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> ist Zn als Bestandteil von Kofaktor F420 essentiell. Während die Rolle von Zink bei den Untersuchungen zur anaeroben Abwasser- und Faulschlammbehandlung kaum Beachtung fand, wurde die Bedeutung bei der Vergärung von NaWaRo und biogenen Reststoffen in mehreren Arbeiten nachgewiesen. [52], [51]

## **Wolfram**

Die Bedeutung von W für den Biogasprozess ist noch wenig erforscht. Dies liegt nicht zuletzt daran, dass der analytische Nachweis neben der apparativen Ausstattung eine gewisse Erfahrung erfordert und die üblicherweise gefundenen Konzentrationen sehr klein sind. [57]

Versuche an Labor-UASB-Reaktoren mit und ohne Dosierung eines Spurenelementpräparates aus Mo, W und Se haben gezeigt, dass der Abbau des Intermediats Propionat bei vollständigem Fehlen der drei Komponenten gehemmt wird. Da der Propionatabbau eine bedeutende Teilreaktion im Zusammenspiel der syntrophen Bakterien mit den methanogenen Archaeen ist, kann eine Unterversorgung mit Wolfram zu einer deutlichen Veränderung der Mikrobiozönose und zu einer verminderten Methanbildung führen. [11] Erklärt wird dieser Effekt dadurch, dass W neben Mo häufig Bestandteil von Dehydrogenasen ist, Versuche mit Zugabe von Einzelkomponenten wurden allerdings nicht vorgenommen. Wolfram kann im Stoffwechsel einiger methogener Archaeen die Rolle von Mo in Dehydrogenasen einnehmen. [58]

## **Weitere essentielle Spurenelemente**

Neben den oben genannten Spurenelementen sind Kupfer (Cu), Bor (B), Vanadium (V) und Chrom (Cr) in der Literatur als essentiell für den Prozess der Methangärung beschrieben worden. In vielen Fällen handelt es sich dabei um die Verwertung sehr spezieller Substrate oder Zwischenprodukte, beispielsweise bei der anaeroben Behandlung von industriellen Abwässern. So ist z.B. für den Organismus *Clostridium Butyricum*, der während der Acidogenese in Klärschlammfaulungsanlagen in Erscheinung tritt, ein Einfluss von B zur Bildung spezieller Enzymkomplexe nachgewiesen worden. [59] Die Bedeutung für NaWaRo-Biogasanlagen ist jedoch noch weitgehend unaufgeklärt. Auf molekularbiologischer Ebene konnten weitere Enzyme oder Enzymkomplexe,

welche die betreffenden Metalle enthalten, identifiziert werden, die Wirkmechanismen sind jedoch auch hier noch vielfach unbekannt. [60] Insbesondere bei Cu wird häufig eine Prozesshemmung bei zu hohen Konzentrationen unterstellt. Eine Untersuchung an mehreren hundert BGA in Deutschland zeigte jedoch, dass dies im praktischen Anlagenbetrieb von untergeordneter Bedeutung ist. [61]

Die stimulierende Wirkung von Spurenelementen auf den Methanbildungsprozess kann auch sekundär sein, z.B. durch Hemmung einer Bakteriengruppe, die um das gleiche Substrat konkurriert. So werden beispielsweise Sulfatreduzierer durch Ni, Co und Zn schon bei geringeren Konzentrationen gehemmt als die methanogenen Archaeen, was als eine indirekte Stimulation der letzteren verstanden werden kann, da beide u.a. Pyruvat als Substrat nutzen können. [30], [41] Die in der Literatur publizierten Bedarfswerte der für Anaerobprozesse wichtigsten Spurenelemente sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Zusammenfassung der publizierten Bedarfswerte für die wichtigsten essentiellen Spurenelemente

Spurenelement	Minimum	Optimum	Quelle
<b>Nickel (Ni)</b>		10,0 mg/kg <sub>TM</sub>	[62]
		4...10 mg/kg <sub>TM</sub>	[41]
	4,0 mg/kg <sub>TM</sub>	16 mg/kg <sub>TM</sub>	[52]
	0,061 mg/L		[12]
		1 mg/L (im Zulauf) 1 µmol/L (im Zulauf)	[7] [49]
<b>Eisen (Fe)</b>		2.400 mg/kg <sub>TM</sub>	[62]
	750 mg/kg <sub>TM</sub>		[52]
	50 mg/L	280 mg/L	[42]
		1.200...3.000 mg/kg <sub>TM</sub>	[41]
<b>Cobalt (Co)</b>		1,8 mg/kg <sub>TM</sub>	[62]
	0,4 mg/kg <sub>TM</sub>	1,8 mg/kg <sub>TM</sub>	[52]
		1,0...4,0 mg/kg <sub>TM</sub>	[41]
	2,0 µmol/L		[49]
<b>Selen (Se)</b>		0,5 mg/kg <sub>TM</sub>	[62]
	0,05 mg/kg <sub>TM</sub>		[52]
		0,4...2,0 mg/kg <sub>TM</sub>	[41]
<b>Zink (Zn)</b>	30 mg/kg <sub>TM</sub>	200 mg/kg <sub>TM</sub>	[52]
		100...250 mg/kg <sub>TM</sub>	[41]
<b>Mangan (Mn)</b>	100 mg/kg <sub>TM</sub>	300 mg/kg <sub>TS</sub>	[52]
<b>Molybdän (Mo)</b>		4,0 mg/kg <sub>TM</sub>	[62]
	0,05 mg/kg <sub>TM</sub>		[52]
		2,6...8,0 mg/kg <sub>TM</sub>	[41]

Aufgrund der sehr unterschiedlichen Ansätze in der Zielstellung und Methodik der einzelnen Arbeiten wurden unterschiedliche Bedarfswerte ermittelt, die sich in einigen Fällen, wie z.B. bei Se, sogar in der Größenordnung unterscheiden.

### 3. Material und Methoden

Wie in der Zielstellung in Kapitel 1 formuliert, sollen mit der vorliegenden Arbeit praxisrelevante Zielkonzentrationen für Spurenelemente in Biogasfermentern ermittelt werden. Der in der Arbeit verfolgte methodische Ansatz lässt sich wie folgt darstellen:

- **Methodenentwicklung:** Im ersten Schritt wurde eine Methode zur Beurteilung und Quantifizierung der biologischen Aktivität der Fermenterbiologie erarbeitet.
- **Anlagenscreening:** Anschließend erfolgte eine Beprobung und Untersuchung einer großen Anzahl von Biogasfermentern. Dabei wurden sowohl die biologische Aktivität mittels der entwickelten Methode untersucht, als auch verfahrenstechnische Parameter erfasst und eine umfangreiche chemische Analyse der Fermenterprobe mit besonderem Schwerpunkt auf die Spurenelementkonzentrationen durchgeführt.
- **Gruppierung:** Die untersuchten Biogasfermenter wurden anhand der ermittelten biologischen Aktivität in Gruppen etwa gleicher Abbauaktivität zusammengefasst. Mit Hilfe statistischer Kennwerte wurden Zusammenhänge zwischen der biologischen Abbauaktivität und den Konzentrationen der einzelnen Spurenelemente gesucht. Dabei wurden weitere Einflüsse auf die biologische Aktivität, wie z.B. die in Kapitel 2.2 beschriebenen Hemmeffekte, soweit wie möglich berücksichtigt. In Einzelfällen wurden die betreffenden Fermenter aus dem Untersuchungsfeld ausgeschlossen.
- **Ableitung von Zielkonzentrationen:** Aus den gefundenen Zusammenhängen wurden für den praktischen Anlagenbetrieb relevante Untergrenzen für anzustrebende Konzentrationen für die im Screening untersuchten Spurenelemente abgeleitet.

Um die Vergleichbarkeit der Untersuchungsergebnisse untereinander zu gewährleisten, waren bei der Auswahl der zu untersuchenden Fermenter gewisse Beschränkungen unumgänglich. Die überwiegende Mehrzahl der Biogasanlagen in Deutschland lässt sich hinsichtlich der Systematik der Verfahren als zweistufige, einphasige, mesophile Nassfermentation in vollständig durchmischten Rührkesselfermentern beschreiben. Dementsprechend wurden Anlagen, welche Sonderverfahren repräsentieren (wie beispielsweise Feststoffvergärung mit Perkolation) nicht untersucht. Bei den wenigen im Untersuchungsfeld vertretenen zweiphasig betriebenen Anlagen erfolgten Probenahme und Untersuchung nur aus der Methanisierungsstufe.

Eine gezielte Beprobung von „Problemanlagen“ im Sinne des Untersuchungsziels wurde ebenfalls vermieden, vielmehr sollte das gesamte im praktischen Anlagenbetrieb auftretende Spektrum der Spurenelementversorgung erfasst werden. Diese Vorgaben waren während der Screeningphase nicht immer



vollständig umsetzbar, da Betreiber oder Verantwortliche für den Anlagenbetrieb in vielen Fällen kaum Angaben zum aktuellen Betriebszustand des Fermenters machen konnten.

Eine weitere Einschränkung des Untersuchungsfeldes ergibt sich aus der besonderen Situation, dass im vorliegenden Fall der Fermenterinhalt, genauer gesagt die Aktivität der Mikrobiozönose des Fermenters, die zu untersuchende Größe ist. Damit sind alle Einflüsse, welche die Aktivität beeinflussen, soweit wie möglich zu eliminieren oder wenigstens einheitlich zu gestalten. Dies betrifft in besonderem Maße die Zeitverzögerung zwischen der Probenahme und dem Beginn des Aktivitätstests entsprechend Kapitel 3.2. Die Auswahl der zu beprobenden Anlagen erfolgte dementsprechend auch nach erforderlichen Transportwegen bzw. -zeiten. Nach ersten Vorversuchen wurde festgelegt, dass eine Zeitdifferenz von bis zu 6 h zwischen Probenahme und Versuchsbeginn noch toleriert werden kann. Lediglich bei einer Biogasanlage im Untersuchungsfeld war diese Vorgabe aufgrund der Entfernung zum Versuchslabor nicht einzuhalten. Hier betrug die Zeitverzögerung ca. 14 h. Dieser Fermenter wurde jedoch mehrfach in größeren zeitlichen Abständen beprobt und die biologische Aktivität zum jeweiligen Zeitpunkt bestimmt. Wie im Kapitel 4 dargelegt wird, lassen sich auch aus diesen Daten Aussagen bezüglich des Untersuchungsziels ableiten.

### **3.1. Analytik zur Charakterisierung der Fermenterproben**

Alle im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Fermenterproben wurden parallel zu dem im Kapitel 3.2 dargestellten Aktivitätstest einer umfangreichen Analytik unterzogen. Die Analysen umfassten Grundparameter, welche für die Durchführung oder Auswertung der Aktivitätstests relevant sind, wie z.B. der Anteil der Trockenmasse (TM) und organischer Trockenmasse (oTM) sowie die Dichte. Für eine allgemeine Charakterisierung der Fermenterproben wurden darüber hinaus die Gehalte an Hauptnährstoffen N, P, K und S sowie die Summenparameter flüchtige organische Säuren (FOS) und gesamter anorganischer Kohlenstoff (TAC) bestimmt. Die Gehalte an ausgewählten essentiellen Spurenelementen sind zentrales Thema dieser Arbeit, demzufolge bildete deren analytische Bestimmung eine Grundvoraussetzung. Die Darstellung der für die einzelnen Analysen angewandten Verfahren, Methoden und ggf. Normen erfolgt in den folgenden Kapiteln.

#### **3.1.1. Bestimmung der Grundparameter**

Die Bestimmung des Anteils der Trockenmasse sowie der organischen Trockenmasse als Glühverlust der TM erfolgte nach DIN EN 12880 bzw. 12879.[63], [64] Dazu wurden ca. 30 g der homogenisierten Fermenterprobe in einen trockenen Porzellantiegel eingewogen und bei 105 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Aus der Massendifferenz wurde der Wasseranteil bzw. der

Anteil der TM berechnet. Anschließend wurde die getrocknete Probe bei 550 °C über 6 h verascht. Nach dem Abkühlen im Exsiccator wurde aus der Massendifferenz die oTM als Glühverlust der TM berechnet. Die Bestimmung erfolgte für jede Fermenterprobe in dreifacher Wiederholung.

Zur allgemeinen Beurteilung der Prozessstabilität von Biogasfermentern haben sich die Summenparameter flüchtige organische Säuren (FOS) und gesamtorganischer Kohlenstoff (total anorganic carbon, TAC) etabliert. [65] Die Parameter stammen ursprünglich aus der Abwasseranalytik, haben sich jedoch als praxistaugliche und zudem vergleichsweise einfach und schnell bestimmbare Hilfe beim Betrieb von Biogasanlagen erwiesen. [65]

Für die Messung wird die Fermenterprobe durch ein Sieb mit 1 mm Maschenweite gegossen und so von groben Feststoffen befreit. Anschließend werden ca. 40 ml der Flüssigphase für 20 Minuten bei einer Beschleunigung von 6.000 g zentrifugiert. 5 ml des Überstandes werden anschließend mit Schwefelsäure ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ;  $0,05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) bis zu einem pH-Wert von pH 5,00 und anschließend bis pH 4,40 titriert. Aus dem Verbrauch von  $\text{H}_2\text{SO}_4$  bis zum jeweiligen Titrationspunkt, gemessen in ml, werden anhand empirisch ermittelter Formeln die Parameter TAC und FOS berechnet. [66] Für die Messungen im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bestimmung mit Hilfe eines automatischen Titrators Typ Titralab® der Fa. Hach Lange durchgeführt.

Die Bestimmung der Gehalte der Hauptnährstoffe N, P, K und S wurde zusammen mit der Spurenelementanalytik im Labor der IS Forschung GmbH in Wahlstedt (siehe hierzu auch Kapitel 3.1.3) durchgeführt. Die Analysen erfolgten nach den Richtlinien des Verbandes Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten e.V. [67].

### 3.1.2. Bestimmung der Dichte der Fermenterproben

Wie im Kapitel 3.2.2 dargelegt, setzt die gravimetrische Bestimmung des Kopfraumvolumens der Gärgefäße die Kenntnis der Dichte der eingefüllten Komponenten voraus. Die zu untersuchende Fermenterprobe stellt ein Dreiphasengemisch aus Flüssigkeit, Feststoffen und eingebetteten Gasblasen dar und bildet den Hauptanteil des Füllvolumens der Gärgefäße. Aufgrund der im Allgemeinen hohen Viskosität von Fermenterinhalt ist eine Messung mit einem Aräometer nicht praktikabel. Aus dem gleichen Grund und zusätzlich wegen des häufigen Vorhandenseins von langfaserigen Feststoffpartikeln ist eine exakte Volumenbestimmung z.B. mit Hilfe eines Maßkolbens ebenfalls erschwert. Aus diesen Gründen wurde nachfolgend beschriebenes Verfahren angewandt.

Ein zylindrisches Glasgefäß mit einem Nennvolumen von 1.500 ml wurde mit exakt 1.000 ml Wasser (unter Verwendung eines Maßkolbens) gefüllt und der Füllstand mit einer permanenten Markierung versehen. Für die Dichtebestimmung

wurde zunächst das leere, trockene Glasgefäß gewogen ( $m_0$ ). Anschließend wurde die zuvor durch Rühren homogenisierte Fermenterprobe bis etwa 2/3 der Markierung eingefüllt und erneut die Gesamtmasse bestimmt ( $m_1 = m_0 + m_{FP}$ ). Dann wurde das Gefäß mit Wasser (20 °C) bis zur Markierung (exakt 1.000 ml) aufgefüllt und erneut die Gesamtmasse ermittelt ( $m_2 = m_0 + m_{FP} + m_w$ ). Durch das Auffüllen mit Wasser wird eine nahezu ebene Flüssigkeitsoberfläche erzielt, was eine exakte Einstellung des Füllstands bis zur Markierung ermöglicht. Das Volumen des zugegebenen Wassers lässt sich nach folgender Gleichung bestimmen:

$$V_w = \frac{m_w}{\rho_w} = \frac{m_2 - m_1}{\rho_w(\theta)} \quad \text{Gl. 1}$$

mit:

$V_w$ : Volumen des Wassers in  $m^3$

$m_w$ : Masse des Wassers in kg

$\rho_w(\theta)$ : Dichte des Wassers in  $kg\ m^{-3}$  bei der Temperatur  $\theta$  in °C)

Die Dichte  $\rho_w(\theta)$  des Wassers bei der jeweils gemessenen Temperatur  $\theta$  wurde nach [7] bestimmt. Die Differenz aus dem Gesamtvolumen von 1.000 mL und dem Volumen des zugegebenen Wassers ist das Volumen der Fermenterprobe, so dass die Dichte  $\rho_{FP}$  der Fermenterprobe nach Gl. 2 berechnet werden kann.

$$\rho_{FP} = \frac{m_{FP}}{V_{FP}} = \frac{m_1 - m_0}{0,001\ m^3 - V_w} \quad \text{Gl. 2}$$

### 3.1.3. Spurenelementanalytik

Wegen fehlender eigener Ausstattung und Kapazitäten wurden die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen zum Spurenelementgehalt der Fermenterproben sämtlich im Labor der IS Forschung GmbH in Wahlstedt durchgeführt. Aufgrund der dort vorhandenen Ausstattung und Kompetenz sowie der regelmäßigen internen und externen Qualitätskontrolle ist eine hohe Zuverlässigkeit der Analysenergebnisse gesichert.

Die Probenaufbereitung erfolgte teilweise im eigenen Labor. Dazu wurden jeweils ca. 500 mL Fermenterprobe in einer Schale aus Silikatglas bei 105 °C über mindestens 48 h getrocknet. Die getrocknete Probe wurde anschließend mit einer Planetenkugelmühle vom Typ Retsch PM 100 auf eine Korngröße  $< 0,5\ mm$  zerkleinert. Die Mahldauer betrug 10 Minuten bei einer Drehzahl von  $500\ min^{-1}$ . Um eine Kontaminierung der Probe durch Materialabrieb auszuschließen, wurden zum Probenhandling keine Laborgeräte aus Stahl oder Edelstahl verwendet. Beim Mahlen mit der Kugelmühle wurden Mahlbecher und Mahlkörper aus Zirkoniumdioxid ( $ZrO_2$ ) verwendet. Von der getrockneten und gemahlenen Probe wurden ca. 20 g an das Labor der IS Forschung GmbH gegeben.

Die weitere Probenvorbereitung im externen Labor umfasste den Aufschluss mittels Mikrowellentechnik. Hierfür wurde ein Gerät vom Typ Mars Xpress der Firma CEM verwendet. Die Einwaage betrug 0,5-0,8 g getrocknetes und gemahlenes Probenmaterial. Der Aufschluss erfolgte unter Zugabe von 8 mL konzentrierter Salpetersäure und 1 mL Wasserstoffperoxid.

- Aufheizphase : 40 min bei 1600 W bis zu einer Temperatur von 190 °C
- Haltephase : 20 min mit 1600 W halten auf 190 °C
- Abkühlphase: 20 min mit 400 Watt auf 20 °C abkühlen

Die aufgeschlossene Lösung wurde anschließend mittels ICP-OES vermessen. Hierfür wurde ein Analysengerät vom Typ *iCAP 6300 Duo ICP OES* der Firma Thermo Fisher mit Autosampler Typ *Cetac ASX-260* verwendet. Die gesamte Methode ist an die EN 15510 [68] angelehnt.

Es wurden die Konzentrationen in mg/kg<sub>TM</sub> folgender Elemente gemessen:

Massenelemente/Makronährstoffe: P, K, S, Mg, Na, Ca

Spurenelemente/Mikronährstoffe: Cu, Ni, Zn, Fe, Bo, Co, Mn, Mo, Se, W

### **3.2. Bestimmung der biologischen Aktivität der Fermenterbiologie**

Aus den Darlegungen im Kapitel 2.2 ist ersichtlich, dass der Prozess der Methangärung ein sehr fein abgestimmtes Zusammenspiel der beteiligten Mikroorganismen erfordert. Eine Hemmung, aber auch eine Beschleunigung nur einer der im Kapitel 2.2 beschriebenen Phasen kann zu einer massiven Störung des Gesamtprozesses führen. Aufgrund der praxisbezogenen Zielsetzung der Arbeit sollte die zu entwickelnde Methode zur Bestimmung der biologischen Aktivität die Beurteilung der gesamten Abbaukette umfassen. Wie sich im Verlauf der Bearbeitung gezeigt hat, ist eine gezielte Untersuchung einzelner Phasen mittels selektiver Substrate zwar ebenfalls möglich, dies war jedoch zu Beginn der Methodenentwicklung nicht das primäre Ziel.

#### **3.2.1. Standardsubstrat**

Entsprechend den in der Einführung formulierten Thesen basiert die Methode auf der zeitlich hoch aufgelösten Messung der Biogasbildung aus einem standardisierten Substrat, wobei unterstellt werden kann, dass die Kinetik der Biogasbildung auch die Kinetik des Substratumsatzes abbildet. Aus diesem methodischen Ansatz ergeben sich bestimmte Anforderungen an das zu verwendende Standardsubstrat.

Die Forderung nach Reproduzierbarkeit ist hierbei von zentraler Bedeutung. Das Substrat muss auch bei langen Versuchsreihen über den gesamten Zeitraum und ggf. an verschiedenen Orten in konstanter Qualität verfügbar sein. Hinzu kommt die Forderung nach einer Quantifizierbarkeit der Ergebnisse. Das bedeutet, dass

der (stöchiometrische) Biogas- und Methanertrag des Substrates bekannt sein muss.

Aus der Forderung nach Quantifizierbarkeit ergibt sich mittelbar die Forderung nach einer hohen Verfügbarkeit für die Mikroorganismen. Nur wenn das Substrat nahezu vollständig im Methangärungsprozess umsetzbar ist, kann der stöchiometrische Biogasertrag als Zielparameter für die Beurteilung der Abbauaktivität verwendet werden. Für die Umsetzbarkeit ist weiterhin das Verhältnis der Hauptinhaltsstoffe, insbesondere das Verhältnis C:N:P, von Bedeutung. In zahlreichen experimentellen Untersuchungen wurde gezeigt, dass für dieses Verhältnis Grenzen bestehen, innerhalb derer das Zusammenspiel der einzelnen Phasen der Methangärung optimal abläuft. [26]

Schließlich ist an das Substrat noch die Forderung zu stellen, selbst frei von Inhaltsstoffen zu sein, die das Untersuchungsziel beeinflussen. In diesem Fall sollten also durch das Substrat selbst keine Spurenelemente in den Versuchsansatz eingetragen werden.

Unter Berücksichtigung aller genannten Forderungen wurde für die Versuche ein synthetisches Komplexsubstrat verwendet, das als Kohlenstoffquellen Stärke, mikrokristalline Zellulose und Glucose sowie Harnstoff und Kaliumphosphat als N- bzw. P-Quelle enthält. Die Zusammenstellung erfolgte in Anlehnung an das von POBEHEIM [51] verwendete Substrat, das eine synthetische Maissilage repräsentiert. Das synthetische Komplexsubstrat entsprechend der in Tabelle 2 angegebenen Zusammensetzung erfüllt die oben genannten Forderungen vollständig.

Tabelle 2: Rezeptur des synthetischen Standardsubstrats

Komponente	Zellulose, mikrokristallin	Maisstärke	Glucose	Harnstoff $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$	Kalium- phosphat $\text{K}_2\text{HPO}_4$
Beschreibung	Merck Standard	Lebensmittel- qualität	p.A. - Qualität		
Massenanteil in g/g <sub>Substrat</sub>	0,310	0,535	0,099	0,037	0,019

Die Rezeptur realisiert ein C:N:P-Verhältnis von 137:5:1. Sie wurde während des gesamten Untersuchungszeitraumes unverändert beibehalten. Der maximale Biogasertrag wurde nach BUSWELL [17] berechnet und beträgt 795 l(N)/kg, bezogen auf die Trockenmasse (TM). Je nach Bedarf wurden für die Versuche Einzelchargen von etwa 500 g angesetzt und die jeweilige Charge durch Einwiegen der Komponenten in 2.000-mL-Gefäße und anschließendes Mischen im Überkopfschüttler für 24 h homogenisiert. In regelmäßigen Abständen, mindestens jedoch einmal monatlich, wurde der Wasseranteil der Mischung bestimmt und

dieser bei der Versuchsauswertung berücksichtigt. Die Bestimmung des Wasseranteils erfolgte entsprechend den Vorgaben der Norm DIN EN 12880 [63].

Im Verlauf der Arbeit wurden auch Versuche mit weiteren synthetischen Substraten durchgeführt. Während das oben beschriebene synthetische Komplexsubstrat zum Teil direkt für die essigsäurebildenden Mikroorganismen verfügbar ist, muss reine Maisstärke vollständig hydrolysiert werden und damit alle Phasen der Methangärung sukzessive durchlaufen. Die Verwendung von Maisstärke als Standardsubstrat erlaubt somit eine getrennte Untersuchung der Hydrolyse/Acidogenese und Acetogenese/Methanogenese sowie der Übergänge zwischen diesen Phasen. Es hat sich im Verlauf der Arbeit gezeigt, dass sich bestimmte Zusammenhänge zwischen der biologischen Aktivität und der Spurenelementversorgung nur durch die Verwendung von Maisstärke als Substrat aufzeigen lassen. [69]

Außerdem wurden einzelne Versuche mit Zugabe von Essigsäure direkt in den Prozess durchgeführt. Acetat ist direkt für die (acetoklastischen) methanbildenden Archaeen verfügbar. Es ist also zu erwarten, dass es möglich ist, mit Hilfe der Gasbildungskinetik aus diesem Substrat direkt die biologische Aktivität dieser speziellen Organismengruppe zu untersuchen.

Weitere Versuchsreihen wurden mit einer Einheitscharge getrockneter und gemahlener ( $\leq 1\text{mm}$ ) Maissilage als Substrat durchgeführt. Damit sollte ein praxisnahes Komplexsubstrat untersucht werden. Der große Nachteil dabei ist, dass aufgrund des nicht exakt quantifizierbaren Biogasertrags eine normierte Darstellung der Gassummenkurve nur eingeschränkt möglich ist.

Bei der ausführlichen Auswertung der Versuchsdaten im Kapitel 4 wurden die Versuche mit den beiden letztgenannten Substraten jedoch nicht berücksichtigt, weil im Vergleich mit dem synthetischen Standardsubstrat entsprechend Tabelle 2 nur wenige Versuche durchgeführt wurden und auftretende Sondereffekte eine vergleichende Auswertung erschweren.

### 3.2.2. Messung der Biogasbildung

Für die zeitlich hoch aufgelöste Messung der Biogasbildung wurde das *ANKOM<sup>RF</sup> Gas Production Measurement System* der Firma ANKOM Technology, Macedon, (USA) verwendet. Das System besteht aus Messmodulen, die über einen Gewindeanschluss mit Glasgewinde GL 45 verfügen. Die Messmodule können somit auf Gärgefäße verschiedener Größen aufgeschraubt werden. In jedem Messmodul befinden sich ein Drucksensor, ein Spülanschluss und ein Magnetventil zur Druckentlastung. Der Drucksensor erfasst den aktuellen Druck im Gasraum des jeweiligen Gärgefäßes. Der zulässige Maximaldruck im Gärgefäß kann softwaremäßig für jedes Modul im Bereich von 0 bis 100 kPa frei gewählt werden. Beim Erreichen des eingestellten Enddrucks wird das Entlastungsventil

für eine frei wählbare Zeitspanne geöffnet und ermöglicht so eine Druckentlastung. Der Spülanschluss ermöglicht es, den Kopfraum des Gärgefäßes nach dem Verschließen mit einem Inertgas, z.B. Stickstoff, zu spülen. Für die Spannungsversorgung ist jedes Modul mit einem eigenen Akkupack ausgestattet.

Der Datenaustausch mit dem PC erfolgt drahtlos über eine Bluetooth®-Verbindung, wobei maximal 50 Module mit einem zentralen Controller erfasst werden können. Die mitgelieferte Auswerte- und Steuersoftware ermöglicht folgende Einstellungen:

life interval	Zeitintervall für die Übertragung der Messdaten an den PC. Gewählte Einstellung: 30 s
recording interval	Zeitintervall für die Speicherung der Messdaten in einer externen Datei. Gewählte Einstellung: 30 min.
pressure release	Öffnungsdruck des Magnetventils; maximaler Überdruck gegen Umgebung im Gasraum des jeweiligen Gärgefäßes. Gewählte Einstellung: 5 kPa
valve opening time	Zeitdauer, die das Magnetventil zur Druckentlastung öffnet. Gewählte Einstellung: 250 ms

Der aktuelle Luftdruck wird von einem separaten Modul (zero module) gemessen und Schwankungen des Umgebungsdrucks bei der Datenerfassung werden entsprechend berücksichtigt. Das System liefert als Ausgangsdaten den kumulierten Druckanstieg im Kopfraum des jeweiligen Gärgefäßes unter Berücksichtigung eventueller Schwankungen des Umgebungsdrucks.

Zur Berechnung des gebildeten Gasvolumens aus dem Druckanstieg kann die thermische Zustandsgleichung idealer Gase herangezogen werden. [70] Bei konstantem Volumen und konstanter Temperatur ist die Zunahme der Gasmenge direkt proportional zum gemessenen Druckanstieg:

$$dn = dp \cdot \frac{V_k}{R \cdot T} \quad \text{Gl. 3}$$

mit:

dn: Änderung der Stoffmenge in kmol

dp: Druckänderung in Pa

$V_k$ : freies Kopfraumvolumen im Gärgefäß in  $\text{m}^3$

R: allgemeine Gaskonstante  $R = 8.314,41 \text{ J} \cdot \text{kmol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$

T: Temperatur des Gases in K

Die Forderung nach Temperaturkonstanz wird durch das Temperieren der Gärgefäße, und zwar des gesamten Gefäßes einschließlich des Kopfraumes, in einem Wasserbad eingehalten.

Durch die Einstellung des Druckentlastungsventils wird sichergestellt, dass der Gültigkeitsbereich für die allgemeine Gasgleichung sicher eingehalten wird. Des Weiteren bleibt das Druckniveau niedrig genug, um Fehler durch die druckabhängige Löslichkeit der Gaskomponenten, insbesondere CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>S, vernachlässigbar klein zu halten.

Im betrachteten Druckbereich (bis ca. 150 kPa Absolutdruck) kann das Gas mit ausreichender Genauigkeit als ideales Gas mit einem molaren Volumen von  $V_0 = 22,4 \frac{L(N)}{mol}$  angenommen werden. [70] Die Volumenänderung kann somit aus der Druckänderung berechnet werden und ergibt sich wegen der entsprechenden Dimension von  $V_0$  unmittelbar als Normvolumen.

$$dV = dp \cdot \frac{V_k \cdot V_0}{R \cdot T} \quad \text{Gl. 4}$$

Die Methode setzt voraus, dass das Kopfraumvolumen  $V_k$  des jeweiligen Gärgefäßes möglichst genau bekannt ist. Dazu wurde das Volumen  $V_n$  jedes einzelnen verwendeten Gärgefäßes gravimetrisch durch Auslitern mit Wasser und unter Berücksichtigung der temperaturabhängigen Dichte des Wassers bestimmt. Für die Beziehung zwischen Temperatur und Dichte von Wasser wurden die Berechnungsgleichungen aus dem VDI-Wärmeatlas [71] verwendet. Die Volumina  $V_n$  sind für jedes Gefäß in der im Kapitel 3.2.5 beschriebenen Auswerteroutine hinterlegt worden. Zur Berechnung des freien Kopfraumvolumens wurde weiterhin angenommen, dass die Dichte der eingefüllten Fermenterprobe  $\rho_{(FP)} = 1.000 \text{ kg/m}^3$  beträgt. Der mit dieser Annahme verbundene Fehler kann durch Messungen der tatsächlichen Dichte von Fermenterproben abgeschätzt werden. Messungen an 15 verschiedenen Fermenterproben (siehe Kapitel 3.1.2) ergaben Dichten von 973 kg/m<sup>3</sup> bis 1.013 kg/m<sup>3</sup> bei einem Mittelwert von 997 kg/m<sup>3</sup>. Bei der Annahme  $\rho_{(FP)} = 1.000 \text{ kg/m}^3$  beträgt der mittlere Fehler damit 0,51 % und ist hinnehmbar klein.

Die Volumenänderung durch das zugegebene Substrat kann aufgrund des geringen Beitrags zur Gesamtmasse sowie aufgrund der nahezu vollständigen Löslichkeit vernachlässigt werden.

Für die Versuche im Rahmen der vorliegenden Arbeit standen zu Beginn 12 Module zur Verfügung, im weiteren Verlauf wurde die Anzahl auf insgesamt 36, aufgeteilt auf drei Systeme mit jeweils 12 Modulen, erhöht. Als Gärgefäße wurden Duran® Flaschen der Fa. Schott mit Kunststoffüberzug als Splitterschutz mit einem Nennvolumen von 500 mL verwendet. Die Gärgefäße sowie die dazugehörigen Module wurden nach dem Schlüssel *System.Modul*, also mit der Nummerierung 1.1 (System 1; Modul/Gärgefäß Nr. 1) bis 3.12 (System 3; Modul/Gärgefäß Nr. 12), gekennzeichnet. Dieser Identifikationsschlüssel findet auch bei der Darstellung der Versuchsergebnisse Verwendung. Jedes Gärgefäß wurde



außerdem mit einem Magnetrührstab bestückt, um den Inhalt (arbeits-)täglich einmal mittels eines Magnetrührers zu homogenisieren.

Aufgrund der leichten Abbaubarkeit bei gleichzeitig hoher Verdaulichkeit des Standardsubstrates sowie des vergleichsweise kleinen Substrat/Inokulum-Verhältnisses konnte die Versuchsdauer auf 7 d begrenzt werden. Wie im Kapitel 4 dargelegt wird, können aktive Fermenterproben unter diesen Randbedingungen das Substrat innerhalb dieser Zeitspanne zu ca. 80 % umsetzen.

### 3.2.3. Probenahme und Versuchsvorbereitung

Die Fermenterprobe, genauer die Mikrobiologie in der Fermenterprobe, stellt den eigentlichen Untersuchungsgegenstand dar. Damit kommt der Probenahme im Rahmen dieser Arbeit eine besondere Bedeutung zu. Prozesse oder Einflüsse, die während der Probenahme oder der weiteren Behandlung der Fermenterprobe bis zum Versuchsbeginn die Aktivität der Mikroorganismen verändern können, sind so weit wie möglich zu vermeiden. Soweit diese Einflüsse nicht oder nur mit erheblichem Aufwand vermeidbar sind (z.B. der Kontakt mit Luftsauerstoff während der Entnahme), sind sie so zu gestalten dass der Effekt für alle Proben möglichst gleich ist.

Die technischen Einrichtungen zur Probenentnahme an Biogasfermentern sind sehr verschieden in Ausführung und Handhabung, besonders an älteren Biogasfermentern sind hierfür häufig keine gesonderten Einrichtungen vorhanden. Um die Probenahme und den Transport entsprechend den Untersuchungszielen möglichst einheitlich und ohne Verfälschungen zu gestalten, wurden die folgenden Festlegungen getroffen und eingehalten:

- Die Entnahme erfolgt wenn möglich aus dem Probenahmestutzen des Hauptfermenters. Es ist zunächst ein Volumen von mindestens 10 L zu entnehmen und zu verwerfen, bevor die eigentliche Probe entnommen wird.
- Die Probenahme sollte aus dem homogenisierten Behälter, d.h. möglichst unmittelbar nach einem Rührvorgang, erfolgen.
- Wenn direkt am Hauptfermenter keine Möglichkeit zur Probenahme besteht, kann diese auch aus einer Umwälzleitung entnommen werden. Die Umwälzleitungen dienen im normalen Anlagenbetrieb dem Volumenaustausch zwischen den einzelnen Fermentern bzw. zwischen Hauptfermenter und Nachgärer. Die Förderrichtung muss daher so eingestellt werden, dass die zu entnehmende Probe aus dem Hauptfermenter stammt, weiterhin sollte vor der Probenahme die Umwälzung mindestens 5 min. lang laufen. Auch hier ist vor der eigentlichen Probenahme ein Volumen von mindestens 10 L zu entnehmen und zu verwerfen.

- In Ausnahmefällen kann die Probenahme auch aus dem Überlauf zum Gärrestlager erfolgen.
- Die Probenahme sollte nicht während bzw. unmittelbar nach einer Substratzuführung in den Fermenter erfolgen. Die Versuchspraxis hat gezeigt, dass Kurzschlussströmungen nicht auszuschließen sind und die Probe dadurch unvergorenes Substrat enthalten kann.

Die Proben wurden in PP-Fässern mit einem Nennvolumen von 30 L transportiert. Das Probenvolumen lag zwischen 20 und 25 L, der Füllungsgrad somit zwischen 66 % und 83 %. Die Fässer wurden während des Transports mit einem Spannringdeckel verschlossen. Wie bereits einleitend beschrieben, betrug die Zeitspanne zwischen Probenahme und Versuchsbeginn maximal 6 h. Alle Abweichungen von den getroffenen Festlegungen wurden protokolliert und sind bei der Darstellung und Diskussion der Ergebnisse benannt.

### 3.2.4. Versuchsdurchführung

Die Versuchsdurchführung folgte so weit wie möglich einem einheitlichen Ablaufplan, um auch hier Einflüsse auf das Versuchsergebnis zu minimieren bzw. für alle untersuchten Proben einheitlich zu gestalten.

Vor Versuchsbeginn wurden die jeweiligen Einwaagen an Fermenterprobe und Standardsubstrat berechnet. Zielgröße war es, jeweils ein Substrat-Inokulum-Verhältnis von ca.  $0,25 \frac{kg_{oTM}(Substrat)}{kg_{oTM}(Inokulum)}$  zu realisieren.

Eine Bestimmung des Anteils an TM bzw. oTM der Fermenterprobe vor Versuchsbeginn ist unter der Maßgabe eines möglichst geringen Zeitverzugs zwischen Probenahme und Untersuchung der Probe nicht möglich. Sofern also keine aktuellen Betreiberangaben vorlagen, wurde der TM-Anteil der jeweiligen Fermenterprobe nach einer visuellen Beurteilung des Fließverhaltens abgeschätzt. Der Anteil der oTM wurde für die Festlegung der Einwaagen mit 78 % der TM angenommen. Aus den anzutreffenden Spannen bezüglich des TM-Gehaltes der Fermenterproben ergeben sich so Einwaagen von 250 bis 350 g Fermenterprobe je Gärgefäß.

Zunächst wurde für alle Gärgefäße die Leermasse  $m_0$  des trockenen Gefäßes incl. Magnetührstab protokolliert. Anschließend wurden die Fermenterproben entsprechend Versuchsplan in die Gärgefäße gefüllt und die Gesamtmasse  $m_1$  (Gärgefäß mit Fermenterprobe) protokolliert. Bei extrem dickflüssigen Proben mit einem TM-Anteil über 10 % wurde die Probe im Gärgefäß mit Reinwasser verdünnt, um die Rührfähigkeit zu gewährleisten, und die Gesamtmasse  $m_2$  (Gärgefäß mit Fermenterprobe und Verdünnungswasser) protokolliert. Erst dann wurden die vorbereiteten Mengen Standardsubstrat zum Versuchsansatz dazugegeben, mittels Magnetrührer zügig eingerührt und die Gärgefäße mit dem jeweils zugehörigen Messmodul verschlossen. Die Reihenfolge der Befüllung mit

Substrat wurde möglichst zufällig vorgenommen. Dadurch sollte ein systematischer Fehler durch unterschiedliche Reaktionszeiten vor Beginn der Datenaufzeichnung vermieden werden. Die befüllten und verschlossenen Gärgefäße wurden anschließend im Wasserbad bei einer Temperatur von 38 °C inkubiert. Die Datenaufzeichnung wurde mit einer zeitlichen Verzögerung von 10 Minuten gestartet. Dadurch wird der Druckanstieg durch die Temperaturerhöhung und die damit verbundene Gasausdehnung im Kopfraum nicht mit aufgezeichnet, und es sind für alle Gärgefäße einheitliche Startbedingungen gegeben.

Von jeder zu untersuchenden Fermenterprobe wurden eine Nullvariante, also ohne Substratzugabe (aber ggf. mit Verdünnungswasser) sowie eine Variante mit Substratzugabe entsprechend den genannten Randbedingungen untersucht. Von einigen Fermenterproben wurden auch Varianten mit Zugabe anderer Substrate (siehe Kapitel 3.2.1) mitgeführt. Die Anzahl der Wiederholungen jeder Variante in einem Versuchsansatz betrug einheitlich  $n = 3$ .

Als Abbruchkriterium für die Versuche wurde auf die Festlegungen der VDI-Richtlinie 4630 zurückgegriffen. Die Versuche wurden abgebrochen, wenn der tägliche Zuwachs der Gassummenkurve weniger als 1 % der bis dahin gebildeten Biogasmenge betrug. [13] Darüber hinaus wurde entsprechend der in Kapitel 1 formulierten Zielstellung (Entwicklung eines Kurztests) die Versuchsdauer auf maximal 7 d begrenzt.

### 3.2.5. Auswertung der Messdaten

Das in Kapitel 3.2.2 beschriebene System liefert als Rohdaten die kumulierten Druckanstiege im Kopfraum der einzelnen Gärgefäße in einer zeitlichen Auflösung von 30 Minuten. Zusammen mit weiteren Randbedingungen und Versuchsparametern ist daraus der zeitabhängige spezifische Biogasertrag des verwendeten Standardsubstrates zu berechnen. Dazu wurden für jeden Ansatz, d.h. für jedes Gärgefäß, die folgenden Berechnungen durchgeführt:

#### Berechnung des freien Kopfraumvolumens

$$V_k(i) = V_0(i) - \frac{m_{FP}(i)}{\rho_{FP}} - \frac{m_w(i)}{\rho_w} \quad \text{Gl. 5}$$

mit:

$V_k(i)$  freies Kopfraumvolumen in L

$V_0(i)$  Gesamtvolumen Gärgefäß in L

$m_{FP}(i)$  Einwaage Fermenterprobe in g

$\rho_{FP}$  Dichte Fermenterprobe (konst. 1.000 g/L)

$m_w(i)$  (wenn zutreffend) Einwaage Verdünnungswasser in g

$\rho_w$  Dichte Verdünnungswasser (konst. 1.000 g/L)

Der Index  $i$  kennzeichnet jeweils die Nummer des Gärgefäßes.

### Berücksichtigung des Eigengasanteils der Fermenterprobe

Mit dem Kopfraumvolumen und dem aufgezeichneten zeitlichen Verlauf des Druckanstiegs  $\Delta p(t)$  kann unter Anwendung von Gl. 4 der zeitliche Verlauf der Biogasbildung berechnet werden. Die spezifische Biogasproduktion, also bezogen auf die Masse organischer Trockensubstanz, wird zunächst für die Nullversuche anhand der Probeneinwaage und des Anteils an TS berechnet.

$$V_{spez}(i)(t) = \frac{V_{BG}(i)(t)}{m_{FP}(i) \cdot oTS_{FP}} \quad \text{Gl. 6}$$

mit:

$V_{spez}(i)(t)$	spezifischer Biogasertrag im Gärgefäß i zum Zeitpunkt t in $L(N) \cdot g_{oTM}^{-1}$
$V_{BG}(i)(t)$	gebildetes Biogasvolumen im Gärgefäß i zum Zeitpunkt t in L
$m_{FP}(i)$	Einwaage Fermenterprobe im Gärgefäß i in g
$oTS_{FP}$	Anteil der organischen Trockenmasse der Fermenterprobe in $kg_{oTM} \cdot kg_{FM}^{-1}$

Der Anteil des Biogasertrags, der aus der Fermenterprobe gebildet wurde, wird als Eigengasertrag oder Restgaspotenzial bezeichnet und ist bei der Auswertung der übrigen Versuche entsprechend zu berücksichtigen. Die Gl. 6 wird für alle Nullversuche angewendet und aus den drei Ansätzen eine mittlere Verlaufskurve für den spezifischen Biogasertrag  $V_{spez,FP}(t)$  als arithmetisches Mittel jedes Messpunktes der Einzelkurven berechnet.

### Berechnung des zeitabhängigen spezifischen Biogasertrags aus dem Standardsubstrat

Für die Berechnung des zeitlichen Verlaufs der Biogasbildung aus dem Standardsubstrat wird wiederum zunächst jeder Einzelansatz mit Standardsubstrat entsprechend Gl. 7 ausgewertet.

$$V_{spez}(i)(t) = \frac{V_{BG}(i)(t) - [V_{spez,FP}(t) \cdot m_{FP}(i) \cdot oTS_{FP}]}{m_{sub} \cdot oTS_{sub}} \quad \text{Gl. 7}$$

mit:

$m_{sub}$	Masse des in den Ansatz i zugegebenen Standardsubstrates in g
$oTS_{sub}$	Anteil der organischen Trockenmasse des zugegebenen Standardsubstrates in $kg_{oTM} \cdot kg_{FM}^{-1}$

Aus den drei Einzelansätzen wird anschließend wiederum für jeden aufgezeichneten Zeitpunkt t das arithmetische Mittel gebildet. Daraus ergibt sich die Verlaufskurve für die spezifische Biogasbildung  $V_{spez,sub}(t)$  aus dem synthetischen Standardsubstrat.

Da das Standardsubstrat aus definierten Einzelkomponenten in fester Rezeptur besteht, lässt sich diese Verlaufskurve normiert darstellen. Als Bezugsgröße

wurde der maximale spezifische Biogasertrag, berechnet nach BUSWELL [17], gewählt. Für die normierte Darstellung wird also  $V_{\text{spez,sub}}(t)$  (der spezifische Biogasertrag zum Zeitpunkt  $t$ ) durch den theoretisch maximalen Biogasertrag des synthetischen Standardsubstrates entsprechend Kapitel 3.2.1 dividiert. Das Ergebnis dieser Auswertung ist eine normierte Summenkurve für die Biogasbildung aus dem verwendeten Standardsubstrat, wie sie beispielhaft in Abbildung 3 dargestellt ist.

Aus der normierten Darstellung lassen sich relativ einfach Informationen über die Biogasausbeute und die Gasbildungskinetik gewinnen. In Abbildung 3 sind beispielhaft zwei Parameter eingezeichnet. Der maximale relative Biogasertrag zu Versuchsende  $V_{\text{rel,max}}$  kann als Maß für den Gesamtumsatz des zugegebenen Substrats dienen. Ein hoher Substratumsatz innerhalb des durch die Zielstellung definierten Zeitrahmens von 7 d ist ein Hinweis auf eine hohe Abbauaktivität der Fermenterbiologie. Auch Aussagen zur Gasbildungskinetik lassen sich bereits aus dieser Darstellung ableiten. Die Zeit, die benötigt wird, um aus dem Standardsubstrat einen definierten prozentualen Anteil des maximalen Biogasertrags zu bilden, kann hier als Bewertungskriterium herangezogen werden.

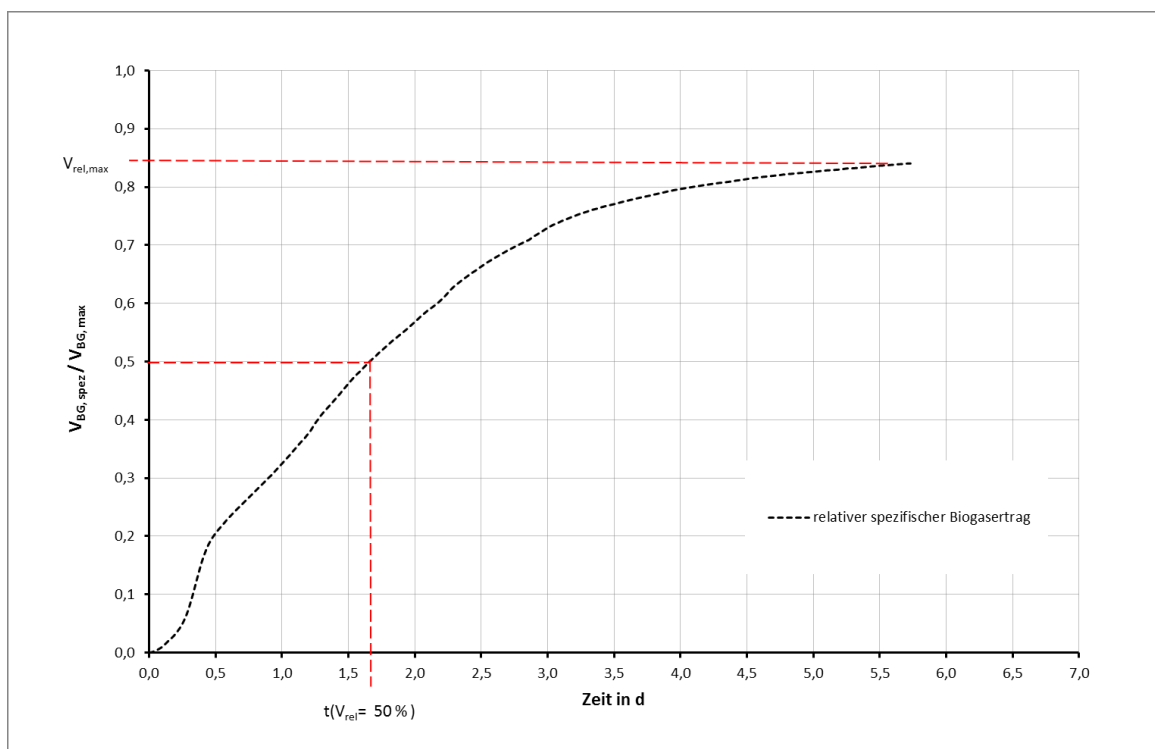


Abbildung 3: Beispiel für eine normierte Gasbildungs-Summenkurve mit Erläuterungen

In Abbildung 3 ist beispielhaft die Zeit dargestellt, innerhalb derer 50 % des maximal möglichen Biogasertrags erreicht werden. Eine eingehende Beschreibung und Diskussion der Bewertungskriterien für die biologische Aktivität erfolgt in Kapitel 4.1.

Die dargestellte Methodik der Versuchsauswertung wurde in Form einer Berechnungsvorlage als MS EXCEL<sup>®</sup>-worksheet umgesetzt.

### 3.2.6. Methodenvalidierung

Um gefundene Unterschiede der biologischen Abbauaktivität verschiedener Fermenterproben hinsichtlich ihrer Signifikanz zu prüfen, ist die Kenntnis der zu erwartenden typischen Messunsicherheit der Methode erforderlich. Zu Beginn der Arbeit stand für die Messungen ein System, bestehend aus 12 Messmodulen entsprechend der Methodenbeschreibung in Kapitel 3.2.2, zur Verfügung. Im weiteren Projektverlauf wurde die Gesamtzahl auf 36 Module, aufgeteilt auf drei Systeme mit jeweils 12 Modulen, erweitert. In den folgenden Darlegungen werden die drei Systeme mit Set 1 (Modul 1-12), Set 2 (Module 2.1 bis 2.12) und Set 3 (Module 3.1 bis 3.12) bezeichnet.

Während der experimentellen Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere Validierungsversuche durchgeführt. Bei diesen Versuchen wurden alle zum jeweiligen Zeitpunkt verfügbaren Module (zu Beginn 12, später bis zu 36 Module) unter möglichst einheitlichen Versuchsbedingungen direkt miteinander verglichen. Als Inokulum wurde Faulschlamm aus der Anaerobstufe einer kommunalen Kläranlage verwendet, um den Einfluss von Inhomogenitäten des Inokulums so weit wie möglich zu eliminieren. Als Substrat wurde das in Kapitel 3.2.1 beschriebene synthetische Standardsubstrat verwendet. Bei der Validierung wurden keine Nullversuche durchgeführt, der Vergleich der Einzelansätze erfolgte direkt auf Basis der gemessenen spezifischen Biogasbildung, bezogen auf die Gesamteinwaage organischer Trockenmasse (Substrat + Inokulum). Das S/I-Verhältnis wurde, wie bei allen durchgeführten Versuchen, mit ca. 0,25 eingestellt (siehe Kapitel 3.2.4).

Für die Auswertung der Versuchsdaten war zu beachten, dass die versuchstypische Messunsicherheit nicht bezüglich des spezifischen Biogasvolumens, sondern bezüglich eines Zeitkriteriums, wie in Kapitel 3.2.5 beschrieben, zu ermitteln ist (vgl. hierzu auch Abbildung 3). Der ermittelte Variationskoeffizient gibt damit die zu erwartende Streubreite der Zeit an, die benötigt wird, um aus dem Standardsubstrat unter gleichen Randbedingungen ein bestimmtes Biogasvolumen zu bilden. Dies ist wichtig, da die Bewertung der Aktivität der Fermenterproben auch auf Basis von Zeitkriterien erfolgt.

Der erste Validierungsversuch wurde zu Beginn der Arbeiten durchgeführt und umfasste 12 Module. Der Verlauf der Gassummenkurven ist in Abbildung 4 gezeigt.

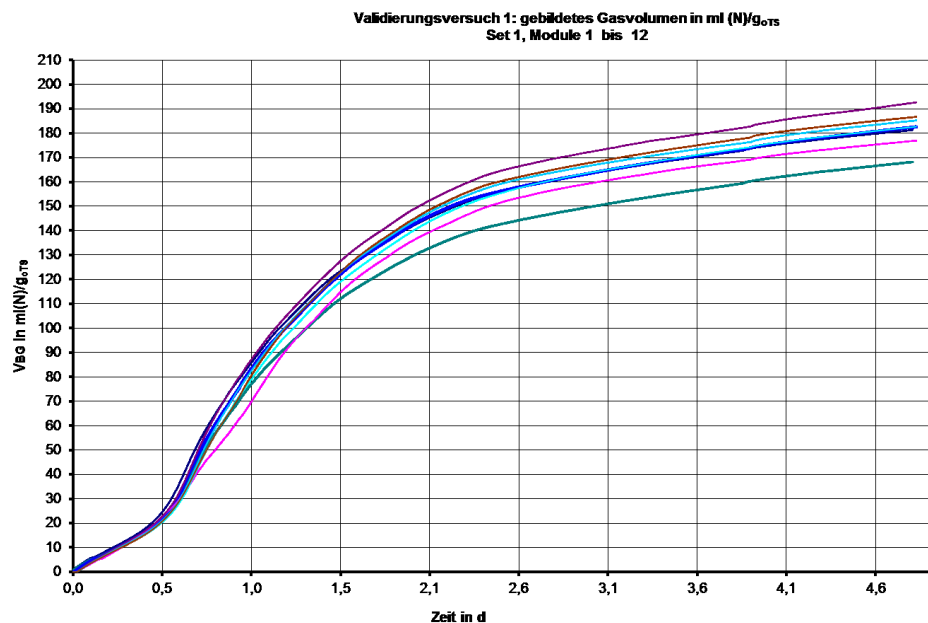


Abbildung 4: Gassummenkurven Validierungsversuch 1

Diese Darstellung gibt einen ersten Eindruck von der zu erwartenden Streuung der Messergebnisse bezüglich des gebildeten Biogasvolumens. Die spezifischen Biogasmengen, für welche jeweils der Variationskoeffizient der Zeitkriterien bestimmt wird, wurden mit 10 / 15 / 20 / 25 / 30 / 50 / 100 und 150 mL<sub>BG</sub>/g<sub>oTM</sub> festgesetzt. Damit ist der Bereich, in dem die zu ermittelnden Zeitkriterien (siehe Kapitel 4.1.1 ) erwartungsgemäß liegen, abgedeckt.

Für den Validierungsversuch 1 sind die Streubreiten und Quartile zu den entsprechenden Zeitpunkten in Abbildung 5 dargestellt. Die zugehörigen Variationskoeffizienten sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Variationskoeffizienten Validierungsversuch 1

Spezif. Biogasmenge V <sub>BG</sub> in mL/g <sub>oTM</sub>	Variationskoeffizient VK (V <sub>BG</sub> )
10	9,1%
15	7,3%
20	4,4%
25	3,7%
30	2,2%
50	3,1%
100	5,0%
150	8,6%

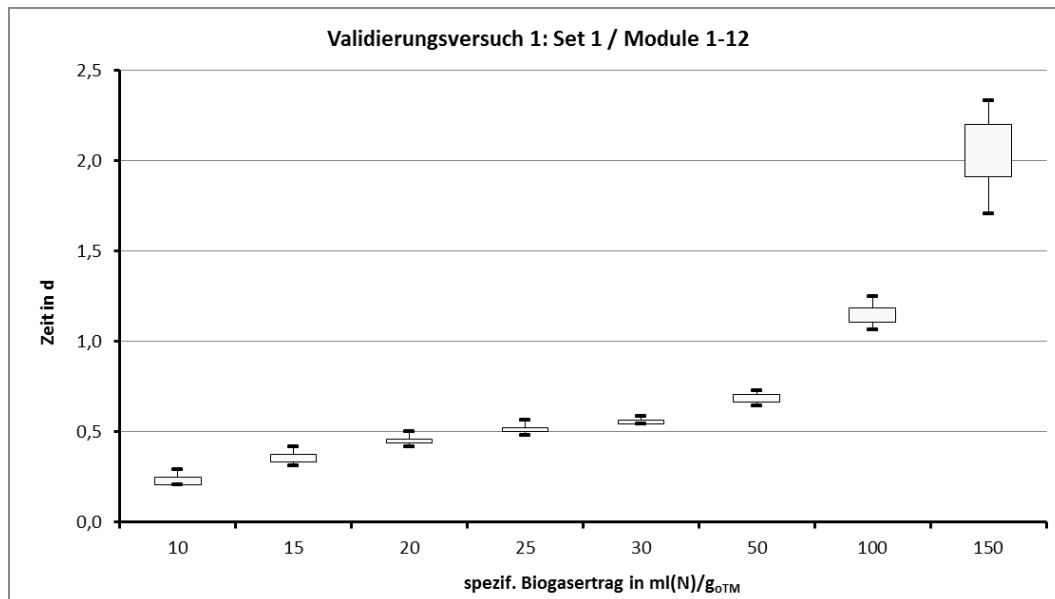


Abbildung 5: Boxplot zum Validierungsversuch 1

Es ist erkennbar, dass sowohl der Interquartilsabstand als auch die gesamte Streubreite mit zunehmender Versuchsdauer leicht ansteigt.

Der Validierungsversuch 2 wurde mit Set 1 und Set 2 mit jeweils 12 Modulen durchgeführt. In Tabelle 4 sind die Variationskoeffizienten bei der Auswertung jeweils eines Sets sowie bei Gesamtauswertung über alle 24 Module angegeben. Die dazugehörigen Grafiken befinden sich im Anhang.

Tabelle 4: Variationskoeffizienten Validierungsversuch 2

Spezif. Biogasmenge $V_{BG}$ in ml/g <sub>oTM</sub>	Variationskoeffizient VK ( $V_{BG}$ )		
	Set1	Set 2	Set 1 + 2
10	6,4%	6,4%	6,3%
15	11,5%	7,9%	9,7%
20	5,1%	4,6%	4,8%
25	3,3%	2,5%	3,0%
30	2,8%	2,2%	2,5%
50	2,7%	3,6%	3,1%
100	4,9%	4,0%	4,8%
150	1,9%	3,0%	2,5%

Im Vergleich zu Validierungsversuch 1 hat sich die Streuung innerhalb der 12 Einzelansätze des Sets 1 leicht vermindert, liegt jedoch tendenziell höher als bei Set 2. Der zunächst beobachtete Anstieg der Streuung mit zunehmender Versuchsdauer hat sich bei diesem Versuch nicht wiederholt. Die Streuung über alle 24 Module des Ansatzes unterscheidet sich nicht wesentlich von der Streuung innerhalb der einzelnen Sets.



Ein dritter Versuch wurde durchgeführt, bevor der Versuchsbetrieb mit Set 3 aufgenommen wurde. Die Zusammenfassung in Tabelle 5 zeigt, dass die Variationskoeffizienten von Set 1 und 2 geringfügig höher waren als in den vorangegangenen Versuchen. Besonders bei Set 1 war zu Beginn eine erhebliche Streuung zu verzeichnen. Ein Ausreißertest nach DEAN-DIXON [72] konnte keinen der betreffenden Messwerte aus Set 1 als Ausreißer identifizieren, so dass das Ergebnis in dieser Form gewertet werden muss. Innerhalb von Set 3 war die Streuung der Messwerte am geringsten und auch niedriger als bei Set 1 oder 2 in den vorangegangenen Validierungen.

Tabelle 5: Variationskoeffizienten Validierungsversuch 3

Spezif. Biogasmenge $V_{BG}$ in ml/g <sub>oTM</sub>	Variationskoeffizient VK ( $V_{BG}$ )			
	Set1	Set 2	Set 3	gesamt: Set 1 + 2 + 3
10	18,9%	8,1%	3,2%	13,2%
15	8,8%	8,1%	4,1%	7,5%
20	6,3%	8,7%	2,8%	6,3%
25	4,8%	8,6%	3,0%	5,7%
30	4,6%	9,5%	2,8%	6,3%
50	3,8%	12,8%	5,8%	8,6%
100	7,4%	10,3%	3,7%	7,9%
150	6,1%	5,4%	3,4%	6,4%

Die Streuung über die gesamten 36 Module lag bedingt durch die etwas größeren Streubreiten der Sets 1 und 2 geringfügig über den im Validierungsversuch 2 ermittelten Werten. Das Gesamtergebnis des dritten Validierungsversuchs ist in Abbildung 6 dargestellt. Der größere Variationskoeffizient in der ersten Versuchsphase wird durch einzelne nach oben abweichende Werte verursacht, die jedoch nicht als Ausreißer interpretiert werden können. Der Variationskoeffizient ist nicht in jeder Versuchsphase gleich hoch. Die geringsten Streuungen wurden für den Wert  $V_{BG} = 25 \text{ ml g}_{oTM}^{-1}$  gefunden. Dieser Wert war bei den Validierungsversuchen nach ca. 12...24 h erreicht (vgl. Abbildung 4). Dies ist von Bedeutung, weil auch die Bewertungskriterien  $t_{50}$  und  $t_{33}$  bei den meisten Fermenterproben in diesen Versuchszeitraum fallen.

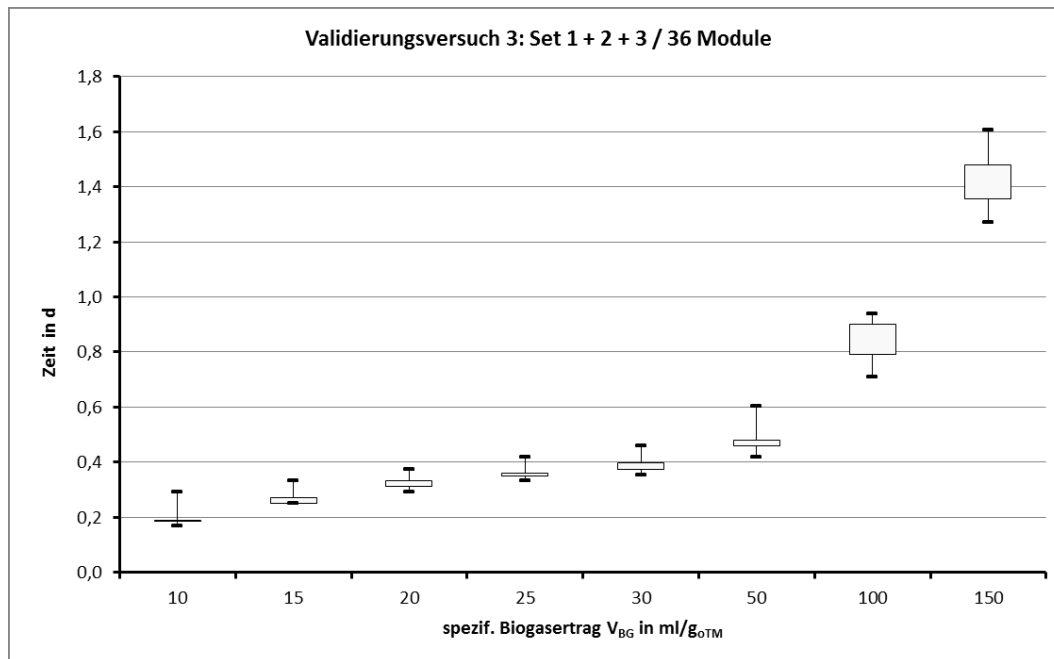


Abbildung 6: Boxplot zum Validierungsversuch 3

Mit Hilfe der Daten des dritten Validierungsversuchs wurde weiterhin geprüft, ob die drei Systeme untereinander bei gleichen Versuchsbedingungen signifikante Abweichungen zeigen. Hierfür wurde ein t-Test mit zweiseitiger Fragestellung durchgeführt. Der t-Test erlaubt die Untersuchung von zwei Stichproben auf Mittelwerthomogenität. Es ist daher erforderlich, drei Paarungen (Set 1 mit Set 2; Set 2 mit Set 3 und Set 1 mit Set 3) zu prüfen. Die Nullhypothese  $H_0$  geht beim ungerichteten t-Test davon aus, dass sich die Mittelwerte zweier Stichproben nicht signifikant unterscheiden. Zu prüfende Werte sind jeweils die Zeiten, zu denen spezifische Gasvolumina von 10, 20, 30, 50 bzw. 100 ml(N)/g<sub>oTM</sub> erreicht wurden. Die verwendete Statistik-Software [73] berechnet als Ergebnis direkt die Prüfgröße  $t$  sowie die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  für eine fälschliche Ablehnung von  $H_0$ . Die ermittelten  $p$ -Werte sind als Ergebnismatrix in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6:  $p$ -Werte für t-Test auf Mittelwerthomogenität

Testpaar	p für $V_{spez.}$ in ml/g <sub>oTM</sub>				
	10	20	30	50	100
Set1-Set2	0,140	0,851	0,532	0,381	0,239
Set2-Set3	0,437	0,239	0,146	0,145	0,430
Set1-Set3	0,083	0,210	0,172	0,256	0,015

Die ermittelten  $p$ -Werte sind bis auf eine Ausnahme  $> 0,05$  bzw.  $> 5\%$ , die Nullhypothese kann also nicht auf dem üblichen Signifikanzniveau von  $5\%$  abgelehnt werden. Lediglich beim Vergleich von Set 1 und Set 3 für ein spezifisches Biogasvolumen von  $V_{spez.} = 100$  ml/g<sub>oTM</sub> unterscheiden sich die

Mittelwerte signifikant. Dies ist auf die große Streuung von Set 1 an diesem Punkt zurückzuführen (siehe Tabelle 5). Das Testergebnis kann dennoch grundsätzlich dahingehend interpretiert werden, dass die Ergebnisse der drei Sets eine gemeinsame Grundgesamtheit bilden.

Als Ergebnis der Validierungsversuche kann somit festgestellt werden:

- Die drei Sets unterscheiden sich nicht signifikant hinsichtlich der Mittelwerte für die Zeitkriterien. Der Vergleich von Proben, die mit unterschiedlichen Sets gemessen wurden, ist zulässig.
- In dem Zeitraum  $0,5d \leq t \leq 1,5d$ , in welchem die meisten Fermenterproben die Kriterien  $t_{50}$  oder  $t_{33}$  erreichen, sind die Variationskoeffizienten tendenziell am niedrigsten.
- Die Streuung der Ergebnisse innerhalb eines Sets liegt im interessierenden Zeitbereich typischerweise zwischen 6 % und 2 %. Der Vergleich verschiedener Sets untereinander ergab Variationskoeffizienten von ca. 8 %.
- Die Validierungsversuche wurden mit einem sehr homogenen Inokulum durchgeführt. Es kann davon ausgegangen werden, dass reale Fermenterproben deutlich inhomogener sind.
- Da die im Laufe der Arbeit untersuchten Fermenterproben mit unterschiedlichen Sets gemessen wurden, wird für die weitere Auswertung ein versuchstypischer Variationskoeffizient von 10 % unterstellt.

#### 4. Ergebnisse und Diskussion

Mit der oben beschriebenen Methodik wurden über einen Zeitraum von 32 Monaten 102 Fermenterproben untersucht. Sofern die Proben aus verschiedenen Fermentern einer Biogasanlage mit mehreren parallelen Vergärungsstrecken stammen, werden sie auch als verschiedene Proben geführt. Es wurden aber auch einige Fermenter im Untersuchungszeitraum mehrfach beprobt. Unter Berücksichtigung dieser Wiederholungen stammen die Fermenterproben von 60 verschiedenen Biogasfermentern. Für die Auswertungen wurden auch die wiederholten Messungen mit herangezogen, wenn die Zeitpunkte der Beprobung weit genug auseinander lagen und somit einen neuen Fermenterzustand repräsentierten. Somit liegen für die Aktivitätsmessungen mit dem synthetischen Standardsubstrat 73 auswertbare Versuche vor. Demgegenüber wurden mit reiner Maisstärke als Substrat nur 29 Versuche durchgeführt, mit Maissilage und Acetat jeweils 26 Versuche.

Um die Konsistenz der Daten zu erhalten, wurden für die Darstellungen in dieser Arbeit keine neuen Probenbezeichnungen eingeführt, sondern die Proben-ID, wie sie im Probeneingangsbuch und der Probendatenbank des Technikums für Abfallwirtschaft und Bioenergie verwendet werden, übernommen. Dadurch ist auch die Anonymisierung der Fermenterproben gewährleistet.

## 4.1. Messungen zur Abbauleistung der Fermenterbiologie

### 4.1.1. Entwicklung von Bewertungskriterien

Als ein Teilziel der Arbeit wurde im Kapitel 1 die Identifikation eines Zusammenhangs zwischen der biologischen Abbauleistung der Fermenterbiologie und der Versorgung mit essentiellen Spurenelementen definiert. Um die biologische Abbauleistung quantifizieren zu können, sind zunächst aus den Versuchsdaten, die mit den oben beschriebenen Batch-Versuchen gewonnen wurden, geeignete Bewertungsparameter zu entwickeln.

Die Geschwindigkeit des Substratumsatzes stellt ein mögliches Kriterium zur Quantifizierung der Abbauleistung der Fermenterbiologie dar. Einfache mathematische Modelle zur Beschreibung der Kinetik des Stoffumsatzes bei der Methangärung unterstellen eine Reaktion erster Ordnung. Dieser Ansatz liefert bei der Modellierung von Batch-Ansätzen gute Übereinstimmungen mit den Versuchsdaten.[74], [75] Für eine Reaktion erster Ordnung mit Limitierung durch den Verbrauch eines Ausgangsstoffes A (Batch-Ansatz) lässt sich die allgemeine Gleichung für die Reaktionsgeschwindigkeit entsprechend Gl. 8 darstellen. [76], [77]

$$\ln c_A(t) - \ln c_A(t=0) = -k \cdot t \quad \text{Gl. 8}$$

mit:

$c_A(t)$ : Konzentration des Substrates A zum Zeitpunkt t in mol L<sup>-1</sup>

$c_A(t=0)$ : Konzentration des Substrates A zu Beginn der Reaktion in mol L<sup>-1</sup>

t: Zeit in s

k: Geschwindigkeitskonstante in s<sup>-1</sup>

Weiterhin kann bei einer Reaktion erster Ordnung der Substratverbrauch durch die Zunahme des gebildeten Reaktionsproduktes ersetzt werden. Nach Einführung des spezifischen Biogasertrags  $y(t)$  des verbrauchten Substrates und Zusammenfassung der logarithmischen Terme wird Gl. 8 zu:

$$\ln \left[ \frac{y_{\max} - y(t)}{y_{\max}} \right] = -k \cdot t \quad \text{Gl. 9}$$

$$y(t) = y_{\max} \cdot (1 - e^{-kt}) \quad \text{Gl. 10}$$

mit:

$y(t)$ : spezifischer Biogasertrag zum Zeitpunkt t in m<sup>3</sup>(N) kg<sup>-1</sup>

$y_{\max}$ : maximaler spezifischer Biogasertrag des Substrats in m<sup>3</sup>(N) kg<sup>-1</sup>

Besonders bei Batch-Versuchen wird häufig zu Beginn eine mehr oder weniger stark ausgeprägte lag-Phase beobachtet, die im Wesentlichen auf Adaptionsvorgänge des Inokulums zurückzuführen ist. Um diese lag-Phase ebenfalls mathematisch zu berücksichtigen, wurde von MÄHNERT UND LINKE ein zusätzlicher Parameter c eingefügt. [75] Die Gleichung nimmt damit folgende Form an:

$$y(t) = y_{\max} \cdot (1 - e^{-kt})^c \quad \text{Gl. 11}$$

Die Halbwertszeit  $t_{1/2}$  ist das Zeitintervall, in dem die Konzentration des Ausgangsstoffes A (siehe Gl. 8) auf den halben Wert abgefallen ist. Die Halbwertszeit beschreibt also denselben Sachverhalt wie die Geschwindigkeitskonstante, ist jedoch für die hier behandelten Vorgänge wesentlich anschaulicher. Für eine Reaktion erster Ordnung gilt: [76]

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \approx \frac{0,7}{k} \quad \text{Gl. 12}$$

Aus den experimentell ermittelten Verläufen für  $y(t)$  können die Parameter  $c$  und  $k$  der Regressionsfunktion mit Hilfe von Methoden der nichtlinearen Regression bestimmt werden. Die unten dargestellten Regressionskurven wurden unter Anwendung der Software MATLAB [78] durchgeführt. Unter MATLAB ist ein spezielles curve-fitting-modul verfügbar, das den Levenberg-Marquardt-Algorithmus nutzt, um für einen Messdatensatz die Parameter einer vorgegebenen Anpassungsfunktion mit einem Minimum der Summe der quadratischen Abweichungen zu bestimmen. [78]

Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante  $k$  ist ein Maß für die Geschwindigkeit des Substratumsatzes und damit ebenso wie  $t_{1/2}$  prinzipiell für eine quantitative Bewertung der Aktivität der Fermenterbiologie geeignet. Die Anwendung der Parameter  $k$  oder  $t_{1/2}$  ist jedoch nicht unproblematisch. Bei der Bestimmung von  $k$  unter Anwendung von Gl. 11 ist zu beachten, dass für  $y_{\max}$  der maximal im Versuch erreichte spezifische Biogasertrag einzusetzen ist, wenn eine optimale Kurvenanpassung erreicht werden soll. Dies kann dazu führen, dass für eine zunächst schnell einsetzende Biogasproduktion, die aber dann auf niedrigem Niveau stagniert, eine hohe Geschwindigkeitskonstante bestimmt wird, obwohl die Fermenterbiologie offensichtlich keine hohe biologische Aktivität im Sinne der Zielstellung aufweist. In Abbildung 7 ist dies am Beispiel der Fermenterproben 262-09 und 049-10 gezeigt. Die beiden Proben unterscheiden sich offensichtlich deutlich hinsichtlich der Umsetzung des Standardsubstrates. Dennoch werden bei der Ermittlung der Parameter entsprechend Gl. 11 ähnliche Werte für die Geschwindigkeitskonstante  $k$  ermittelt. Die Parameter der abgebildeten Regressionskurven sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

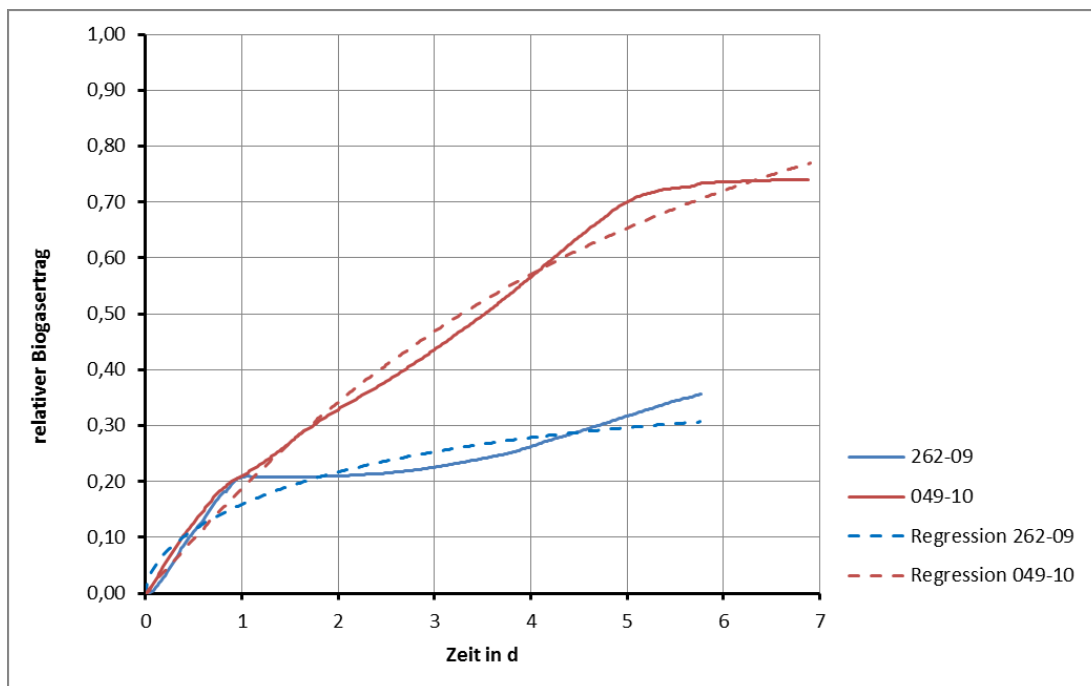


Abbildung 7: Relativer Biogasertag und Verlauf der Regressionskurven für zwei Fermenterproben

Tabelle 7: Parameter der Regressionskurven für die Beispiele aus Abbildung 7

Probe Nr.	$k$ $d^{-1}$	$c$	$R^2$
262-09	0,27	0,54	0,89
049-10	0,22	1,02	0,98

Aus den Daten in Tabelle 8 ist auch ersichtlich, dass sich real gemessene Gassummenkurven nicht immer mit zufriedenstellender Genauigkeit durch eine Funktion nach Gl. 11 approximieren lassen. Das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  liegt im Falle der Probe 262-09 bei unter 0,9.

Des Weiteren ist zu berücksichtigen, dass die Länge und Ausprägung der lag-Phase ebenfalls ein Kriterium für die biologische Anpassungs- oder Leistungsfähigkeit ist. Konsequenterweise müsste dann der zusätzliche Parameter  $c$  aus Gl. 11 mit in die Bewertung der Aktivität der Fermenterbiologie einfließen, wobei eine mehr oder weniger willkürliche Wichtung von  $k$  und  $c$  vorgenommen werden muss. Im anderen Fall, wenn also  $c$  nicht in die Bewertung eingeht, bleibt durch die Berücksichtigung der lag-Phase ein zusätzlicher Parameter, der seinerseits wieder ein gewisses Maß an Willkürlichkeit der Bewertung bewirkt. Es besteht also grundsätzlich die Möglichkeit, dass zugunsten einer optimalen Kurvenanpassung an das mathematische Modell die Aussagefähigkeit der Versuchsergebnisse vermindert wird.

Die Anwendbarkeit der Geschwindigkeitskonstante  $k$  zur Beurteilung der biologischen Aktivität wird zusätzlich dadurch eingeschränkt, dass beispielsweise Hemmungen durch Akkumulation von Zwischenprodukten mit dem Ansatz nach

Gl. 11 nicht adäquat berücksichtigt werden können. Solche Effekte können aber im Rahmen der Aufgabenstellung durchaus relevant sein, wenn z.B. eine durch Spurenelementmangel verlangsamte Methanogenese vorliegt und sich die Intermediate der Acidogenese im Prozess akkumulieren. Schließlich führt auch die Annahme einer Reaktion erster Ordnung nicht in jedem Fall zu sinnvollen Ergebnissen. Es lässt sich zeigen, dass die einzelnen Phasen der Methangärung (siehe Kapitel 2.2) in einem Batch-Ansatz nicht immer parallel ablaufen, sondern zeitlich aufeinander folgend. Speziell bei Versuchen mit Substraten, die vollständig hydrolysiert werden müssen, bevor der weitere Abbau erfolgen kann, ist eine deutlich gestufte Gassummenkurve messbar, wie das nachfolgende Beispiel zeigen soll. [69] In der Abbildung 8 ist eine Gassummenkurve gezeigt, die bei der Vergärung von reiner Maisstärke aufgezeichnet wurde. Zusätzlich ist der zeitliche Verlauf der Gärsäuren (Essigsäure (ES), Propionsäure (PS), Buttersäure (n-BS)) dargestellt. Die Gassummenkurve weist zwei deutlich unterscheidbare lineare Abschnitte auf. Diese lassen sich anhand des zugehörigen Gärsäurespektrums eindeutig den einzelnen Phasen der Methangärung zuordnen. Während des ersten linearen Anstiegs der Gassummenkurve steigen die Konzentrationen aller Gärsäuren an, diese Phase repräsentiert offensichtlich die Hydrolyse/ Versäuerung. Während der zweiten linearen Phase der Gassummenkurve werden Buttersäure und Propionsäure abgebaut, während die Essigsäurekonzentration zunächst noch ansteigt. Im weiteren Verlauf wird auch die Essigsäure nahezu linear abgebaut. Während des zweiten linearen Abschnitts finden also offenbar zunächst die Acetogenese und anschließend die Methanogenese statt.

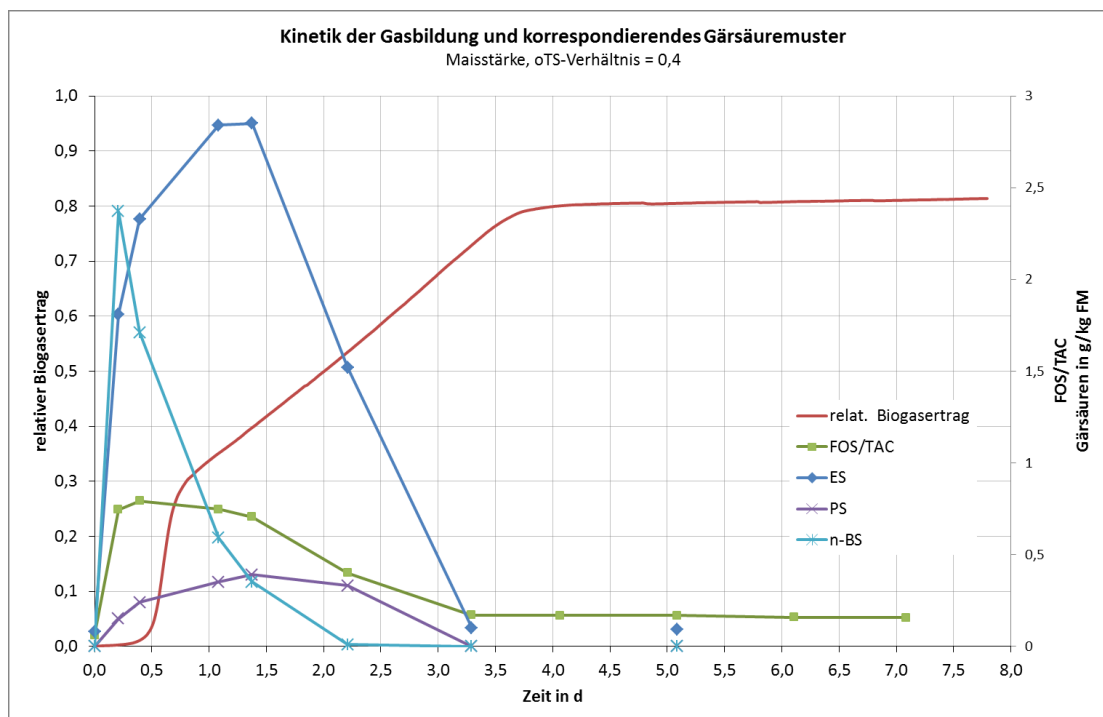


Abbildung 8: Biogasbildung und Verlauf des Gärsäurespektrums bei der Vergärung von reiner Maisstärke

Ein derartiger gestufter Abbau bzw. eine gestufte Gassummenkurve wurde auch in mehr oder weniger stark ausgeprägter Form bei einigen Versuchen mit synthetischem Standardsubstrat beobachtet. Je stärker diese Stufung ausfällt, umso weniger kann die Annahme einer Reaktion erster Ordnung aufrechterhalten werden. Eine mathematische Modellierung der Gassummenkurve mit Hilfe der Gl. 11 ist dann nicht mehr mit hinreichend hohem Bestimmtheitsmaß möglich.

Aus den oben genannten Gründen wurde im Rahmen dieser Arbeit ein anderer Ansatz zur Bewertung der Aktivität der Fermenterbiologie gewählt. Da die Verwendung eines synthetischen Standardsubstrates eine normierte Darstellung der Gassummenkurve ermöglicht (siehe Kapitel 3.2.5), bietet sich die Möglichkeit der Einführung von Zeitkriterien, welche beschreiben, nach welcher Zeitspanne ein bestimmter Anteil des maximal möglichen Biogasertrags aus dem Standardsubstrat gebildet wurde. Das Zeitkriterium  $t_{50}$  beispielsweise gibt die Zeit in d an, nach welcher der spezifische Biogasertrag genau 50 % des im Kapitel 3.2.1 beschriebenen maximal Möglichen beträgt. Bei einem vollständigen und ungehemmten Substratumsatz und unter Annahme einer Reaktion erster Ordnung nimmt  $t_{50}$  den gleichen Zahlenwert an wie  $t_{1/2}$  aus Gl. 12.

Die wesentlichen Vorteile solcher Zeitkriterien sind zum einen die Möglichkeit, diese einfach und direkt aus den Versuchsdaten zu bestimmen, und zum anderen die Flexibilität in der Anwendung, da z.B. auch  $t_{25}$ , oder  $t_{75}$  auf die gleiche einfache Weise ermittelt werden können.

In Abbildung 9 sind beispielhaft die normierten Gassummenkurven von sechs Fermenterproben dargestellt. Die Werte für die Zeitkriterien  $t_{50}$  und  $t_{33}$  sind im Diagramm markiert. In Tabelle 8 sind die Zahlenwerte von  $t_{50}$  und  $t_{33}$  sowie zusätzlich die aus der Regressionsrechnung ermittelten Parameter  $k$  und  $c$  angegeben.

Eine allein auf den Parameter  $k$  aufbauende Wertung (vgl. Tabelle 8) würde bei den angegebenen Beispielen die Probe Nr. 262-09 ähnlich beurteilen wie die Probe Nr. 049-10, obwohl bereits die rein qualitative Betrachtung der Gassummenkurve deutliche Unterschiede erkennen lässt.



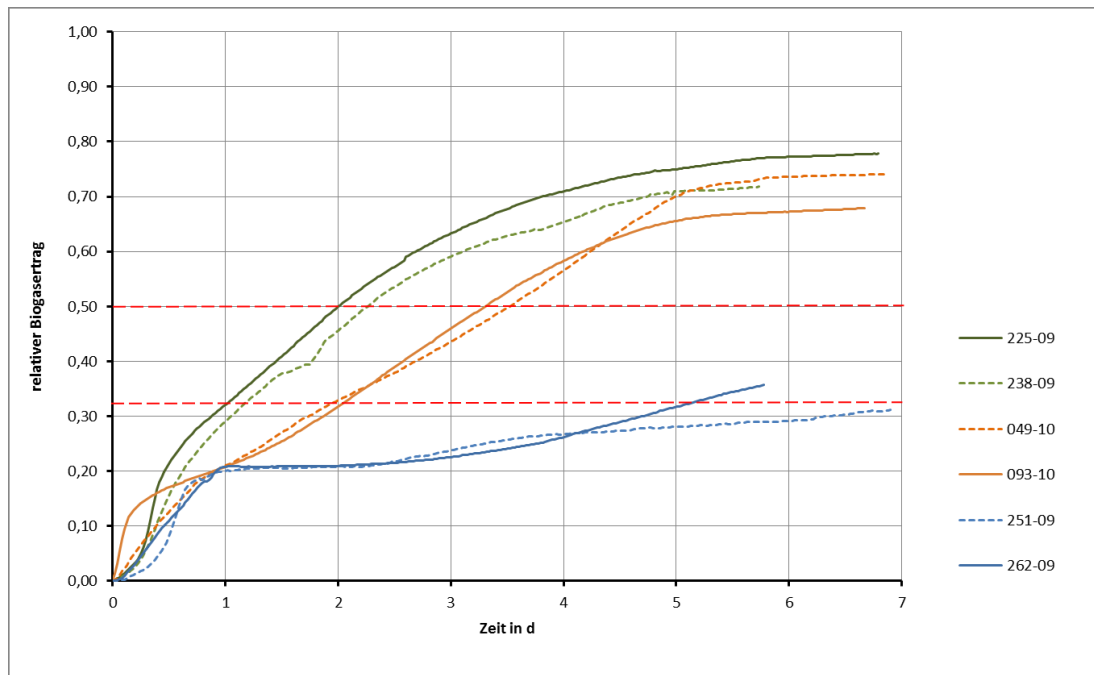


Abbildung 9: Beispiele für gemessene Gassummenkurven und Lage der Bewertungsparameter  $t_{50}$  bzw.  $t_{33}$

Das Beispiel zeigt, dass mit Hilfe der vereinfachten Zeitkriterien eine ausreichend differenzierte Bewertung der biologischen Abbauleistung der Fermenterbiologie möglich ist, auch wenn eine Modellierung der Messdaten durch Gl. 11 nicht mit hinreichender Übereinstimmung gegeben ist.

Tabelle 8: Vergleich der Bewertungsparameter für die Beispiele aus Abbildung 9

Bsp. Nr.	$t_{33}$ d	$t_{50}$ d	$k$ d <sup>-1</sup>	c
225-09	1,0	1,9	0,57	1,08
238-09	1,2	2,2	0,66	1,33
049-10	1,9	3,4	0,50	1,60
093-10	2,1	3,3	0,52	1,42
251-09	6,8	---	0,23	0,49
262-09	5,0	---	0,47	0,66

Die in dieser Arbeit vorgenommenen Auswertungen stützen sich daher auch hauptsächlich auf diese Bewertungsparameter. Es hat sich gezeigt, dass das Kriterium  $t_{50}$  von einigen Fermenterproben nicht innerhalb der vorgegebenen maximalen Versuchsdauer von 7 d erreicht werden konnte. Daher wurde  $t_{33}$  zusätzlich zur Bewertung herangezogen. Dies ist zulässig, weil zwischen beiden Parametern ein starker linearer Zusammenhang besteht, wie die Darstellung in Abbildung 10 zeigt.

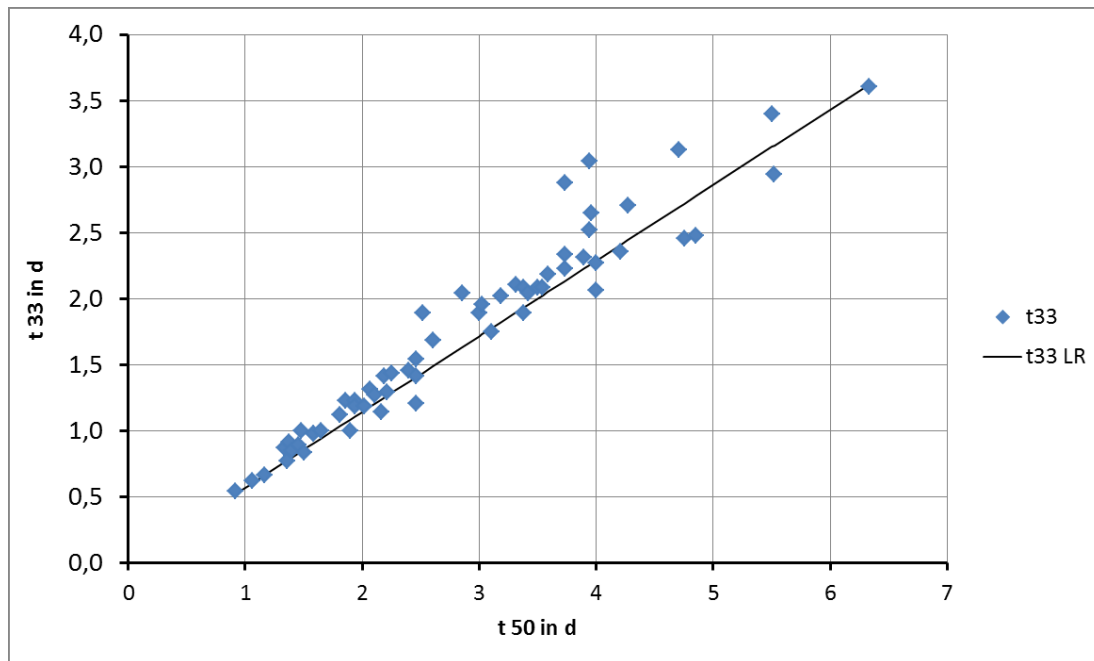


Abbildung 10: Zusammenhang zwischen  $t_{50}$  und  $t_{33}$

Obwohl die Streuung bei höheren  $t_{50}$ -Werten tendenziell zunimmt, wird die lineare Abhängigkeit durch die Gleichung  $t_{33} = 0,572 \cdot t_{50}$ , in Abbildung 10 durch den schwarzen Graphen dargestellt, mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,93$  hinreichend gut belegt.

Wie noch im Kapitel 4.3.1 gezeigt werden wird, lassen sich bei einigen Spurenelementen keine Korrelationen zwischen dem Zeitkriterium  $t_{33}$  und der Spurenelementkonzentration feststellen. Dies betrifft insbesondere die für die Methanogenese essentiellen Komponenten Co und Se. Die oben beschriebene spezielle Charakteristik der Gasbildungskinetik aus reiner Maisstärke lässt sich in diesem Fall nutzen, um die einzelnen Phasen des Substratumsatzes getrennt zu beurteilen. Die in Abbildung 8 dargestellten Phasen der Biogasbildung zeigen bei nahezu allen Versuchen mit Maisstärke einen annähernd linearen Verlauf. Eine getrennte Bewertung der biologischen Aktivität der Acetogenese/Methanogenese kann daher über die Bestimmung des Anstiegs der Gassummenkurve im zweiten linearen Abschnitt erfolgen. Auch für Maisstärke kann ein maximaler Biogasertrag nach BUSWELL berechnet und die Gasbildungskurve normiert dargestellt werden. Der Anstieg hat dann die Dimension  $d^{-1}$  und kann mittels linearer Regression der Messwerte bestimmt werden.

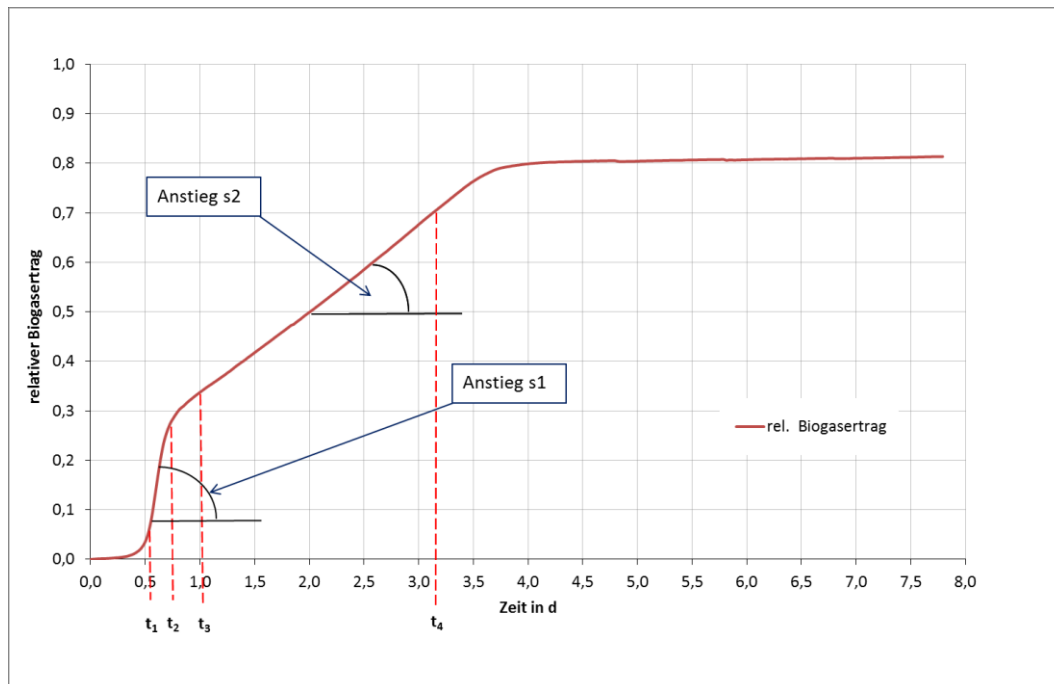
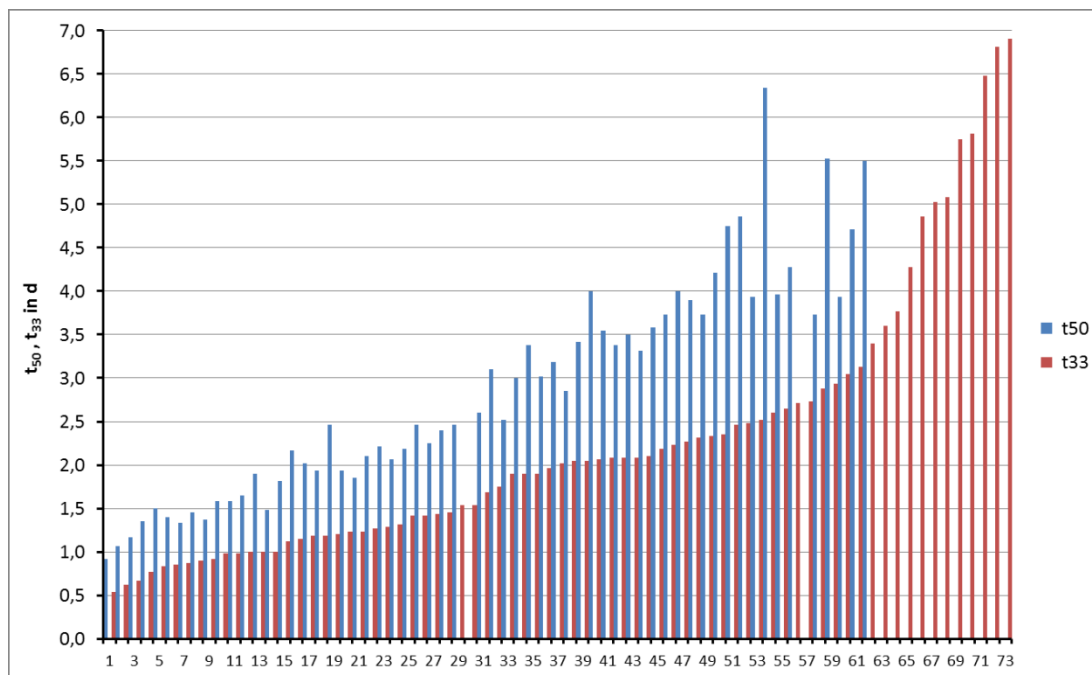


Abbildung 11: Zur Ermittlung der Bewertungskriterien aus den Gasbildungskurven von Maisstärke

Dafür wurde aus den auszuwertenden Gassummenkurven zunächst das Zeitintervall  $t_3 \dots t_4$  ermittelt, in welches die zweite lineare Phase fällt (siehe Abbildung 11). Anschließend wurde für die in dieses Zeitintervall fallenden Datenpunkte eine lineare Regression durchgeführt. Der Anstieg  $s_2$  der Regressionsgeraden kann als Maß für die biologische Aktivität der Acetogenese/Methanogenese dienen.

#### 4.1.2. Ergebnisse der Aktivitätsmessungen

Als Ergebnis der Messungen zur Abbauleistung der Fermenterbiologie liegen für jede untersuchte Fermenterprobe die normierte Gassummenkurve entsprechend Kapitel 3.2.5 und die daraus gewonnenen Zeitkriterien  $t_{50}$  und  $t_{33}$  vor. Wie bereits beschrieben, konnten einige der untersuchten Fermenterproben innerhalb der Versuchsdauer von 7 d das Standardsubstrat zu weniger als 50 % umsetzen. Für diese Proben liegen lediglich die  $t_{33}$ -Werte vor. In Abbildung 12 sind alle gemessenen Werte dargestellt, sortiert nach  $t_{33}$  in aufsteigender Reihenfolge.

Abbildung 12: Gemessene Werte für  $t_{50}$  und  $t_{33}$  (Sortierung: nach  $t_{33}$ , aufsteigend)

Aus der Darstellung lässt sich erkennen, dass für 13 Fermenterproben kein  $t_{50}$ -Wert vorliegt. Die meisten dieser Proben sind am rechten Ende des Diagramms zu finden, also durch hohe  $t_{33}$ -Werte gekennzeichnet. Es gibt jedoch auch Proben, bei denen trotz vergleichsweise niedriger  $t_{33}$ -Werte hohe Werte für  $t_{50}$  gemessen wurden (Nr. 54, 59 und 62 in Abbildung 12) oder die dieses Kriterium gar nicht erreichen konnten (Nr. 30 und 57). Diese Proben zeichnen sich offenbar durch einen zunächst schnellen Anstieg der Gassummenkurve aus, auf den jedoch eine Phase mit nur noch geringer Biogasbildung folgt. Die jeweilige Anzahl der vorliegenden Messwerte sowie die Maxima und Minima der  $t_{33}$ - bzw.  $t_{50}$ -Werte können aus Tabelle 9 entnommen werden.

Tabelle 9: Verteilungswerte der Kriterien  $t_{33}$  und  $t_{50}$ 

Kriterium	Anzahl	Max.	Min.
-	-	d	d
$t_{33}$	73	6,9	0,54
$t_{50}$	60	6,34	0,92

Eine qualitative Betrachtung der Gassummenkurven zeigt, dass sich die Kurvenverläufe grob in drei Gruppen unterteilen lassen. Die Charakteristika der Gassummenkurven dieser Gruppen können wie folgt beschrieben werden:

1. Proben, deren Gassummenkurve vollständig dem zu erwartenden Verlauf entspricht. Es werden  $t_{33}$  von ca. 1 d und  $t_{50}$  von  $\leq 2,5$  d erreicht. Der relative Biogasertrag zu Versuchsende liegt bei 75...80 %.
2. Proben, deren Gassummenkurve zunächst einen schnellen Anstieg aufweist, der im Weiteren jedoch verzögert verläuft. In den meisten Fällen ist eine

deutlich ausgeprägte lag-Phase von ca. 6...10 h erkennbar. Die  $t_{33}$ -Werte liegen bei ca. 2...3 d, die Werte für  $t_{50}$  bei ca. 3...5 d. Zu Versuchsende werden jedoch auch hier wieder relative Biogaserträge von bis zu 70 % erreicht.

3. Proben, bei denen  $t_{50}$  nicht innerhalb einer Versuchsdauer von 7 d erreicht wird. Die Gassummenkurven dieser Gruppe zeigen zumeist eine deutliche lag-Phase von einigen Stunden. Der darauf folgende kurze steile Anstieg bricht nach wenigen h ab und geht in eine flache, langgezogene Phase über. Zu Versuchsende werden maximal 40 % des theoretisch maximalen Biogasertrags erreicht.

Typische Vertreter der jeweiligen Gruppen sind bereits durch jeweils zwei Beispiele in Abbildung 9 vertreten. Die vollständige Darstellung der Gassummenkurven entsprechend der oben vorgenommenen Einteilung findet sich im Anhang.

Die oben getroffene Aussage lässt sich durch die Betrachtung der Häufigkeitsverteilung der beiden Kriterien bestätigen. Das Histogramm für  $t_{50}$  ist in Abbildung 13, für  $t_{33}$  in Abbildung 14 gezeigt.

$t_{50}$ : Histogramm

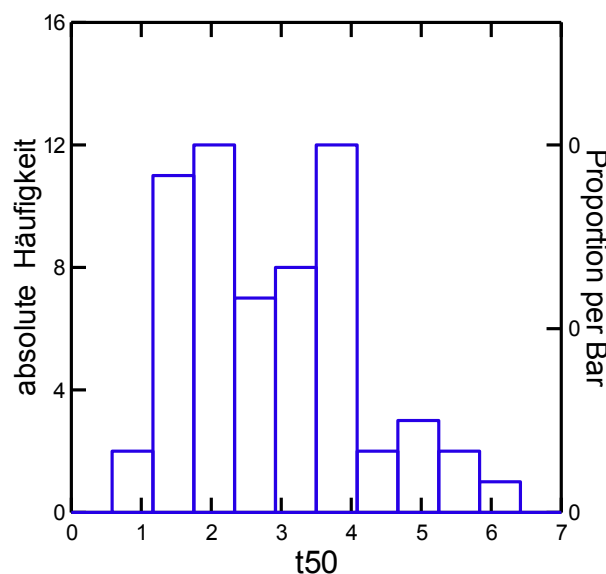
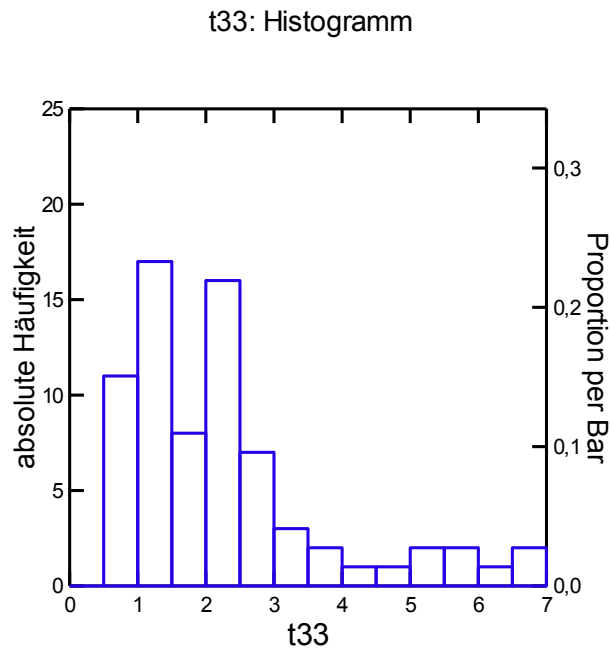


Abbildung 13: Häufigkeitsverteilung der  $t_{50}$ -Werte

Es liegt offensichtlich eine multimodale (mehrgipflige) Verteilung vor, wobei die Lagen der relativen Maxima gut mit den oben beschriebenen Gruppeneinteilungen übereinstimmen.

Abbildung 14: Häufigkeitsverteilung der  $t_{33}$ -Werte

Unter den gegebenen Versuchsbedingungen (identisches, voll verfügbares und leicht abbaubares Substrat, gleiches Substrat/Inokulum-Verhältnis, identische Randbedingungen, keine gezielte Auswahl von problematischen Fermentern) kann unterstellt werden, dass die beobachtete Streubreite der Parameter  $t_{50}$  und  $t_{33}$  ihre Ursachen in den Eigenschaften der Fermenterproben selbst hat.

Die Ergebnisse der Messungen zur Abbaukinetik lassen sich in folgenden Punkten zusammenfassen:

1. Der Ansatz, die biologische Aktivität der Fermenterbiologie durch die Messung der Gasbildungskinetik eines standardisierten Substrats zu bewerten, hat sich als anwendbar erwiesen.
2. Es wurde eine praktikable und – verglichen mit anderen Untersuchungsmethoden – wenig zeitintensive Untersuchungsmethode entwickelt.
3. Die im Rahmen dieser Arbeit angewandten Zeitkriterien ermöglichen eine ausreichend differenzierte Beurteilung der Abbaugeschwindigkeit. Speziell bei Fermenterproben mit verzögertem Substratumsatz erlauben die Kriterien  $t_{50}$  bzw.  $t_{33}$  eine treffendere Differenzierung als z.B. über die Geschwindigkeitskonstante  $k$ .
4. Die gemessenen Werte für  $t_{50}$  und  $t_{33}$  sind nicht normalverteilt, vielmehr liegt eine mehrgipflige Verteilung vor, damit ergibt sich die Möglichkeit der Gruppierung verschiedener Fermenterproben.
5. Ein Substratumsatz von 50 % des theoretischen Maximums konnte nicht von allen untersuchten Fermenterproben innerhalb der Versuchsdauer erreicht werden. Es konnte jedoch ein Zusammenhang zwischen beiden Kriterien

festgestellt werden. Die Verwendung von  $t_{33}$  an Stelle von  $t_{50}$  ist daher gerechtfertigt.

#### 4.2. Gemessene Spurenelementkonzentrationen

Die Spurenelementkonzentrationen in den Fermenterproben wurden mit der in Kapitel 3.1.3 beschriebenen Methode bestimmt. Neben den bereits in Kapitel 2.3 in ihrer Bedeutung ausführlich beschriebenen Elementen Nickel (Ni), Eisen (Fe), Cobalt (Co), Selen (Se), Zink (Zn), Mangan (Mn) und Molybdän (Mo) wurden auch Kupfer (Cu), Bor (Bo) und Wolfram (W) analytisch bestimmt. Aufgrund der großen Unterschiede der gemessenen Konzentrationen erfolgt für die Darstellungen in dieser Arbeit eine Unterteilung in zwei Gruppen. Die erste Gruppe bilden die Elemente Cu, Zn, Fe und Mn, deren Konzentrationen in der Größenordnung 1.000 mg/kg<sub>TM</sub> liegen. Die zweite Gruppe umfasst alle übrigen analysierten Spurenelemente, deren Konzentrationsbereiche um ein bis zwei Größenordnungen kleiner sind. Die gemessenen Minimal- und Maximalwerte sowie die Mittelwerte und Mediane sind in Tabelle 10 und Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 10: Im Untersuchungsfeld gemessene Konzentrationsbereiche der Elemente Cu, Zn, Fe und Mn

Element	Cu	Zn	Fe	Mn
	mg/kg <sub>TM</sub>			
Min.	15,64	71,195	652,75	85,20
Max.	3.024,0	1.956,0	8.624,0	831,59
Median	37,97	169,40	1.718,0	247,26
Arithm. Mittel	127,51	242,69	2.349,1	272,81

Die Streubreite der gemessenen Konzentrationen ist zum Teil sehr hoch. Speziell bei Cu, Zn und Fe erstreckte sich der Konzentrationsbereich über mehrere Größenordnungen. Ein Vergleich des arithmetischen Mittels mit dem Median zeigt auch, dass bei Cu, Zn und Fe der Mittelwert durch das Vorliegen einiger hoher Extremwerte beeinflusst wird. Dieses Phänomen tritt bei Cu am deutlichsten auf.

Tabelle 11: Im Untersuchungsfeld gemessene Konzentrationsbereiche der Elemente Ni, B, Co, Mo, Se und W

Element	Ni	B	Co	Mo	Se	W
	mg/kg <sub>TM</sub>					
Min.	1,39	8,20	0,40	0,68	n.B.	0,152
Max.	38,98	69,75	16,27	7,59	4,23	11,62
Median	6,01	22,21	2,38	3,58	1,06	0,95
Arithm. Mittel	7,17	26,42	3,68	3,57	1,22	1,34

Die gemessenen Cu-Konzentrationen sind in Abbildung 15 in aufsteigender Reihenfolge dargestellt. Man beachte die logarithmische Skalierung der Y-Achse. Demgegenüber steht Se als Beispiel für relativ gleiche Konzentrationen innerhalb des Untersuchungsfeldes.

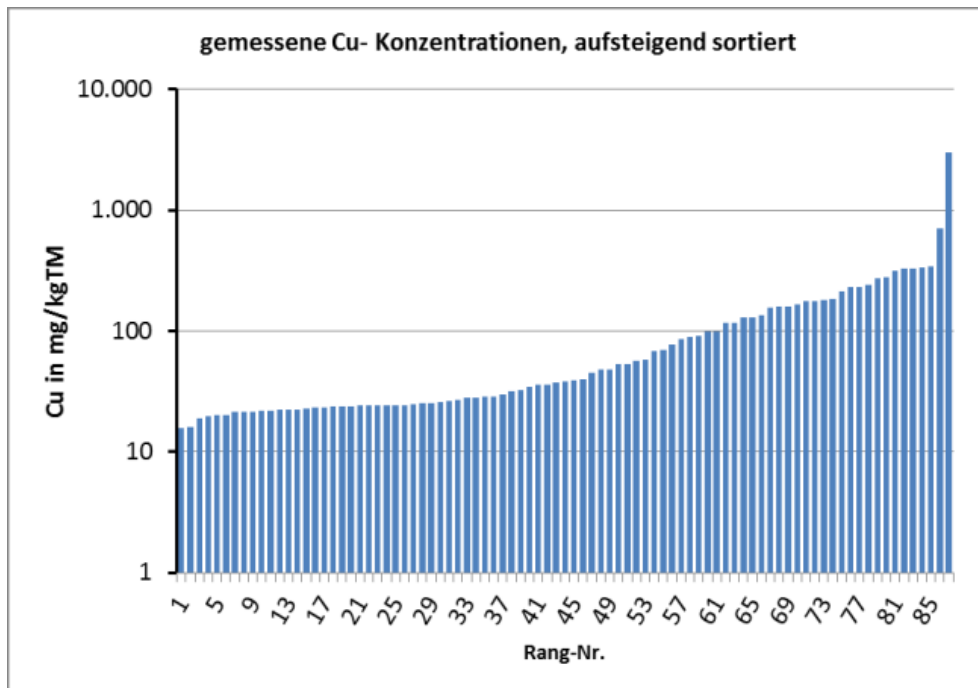


Abbildung 15: Gemessene Cu-Konzentrationen (aufsteigend sortiert)

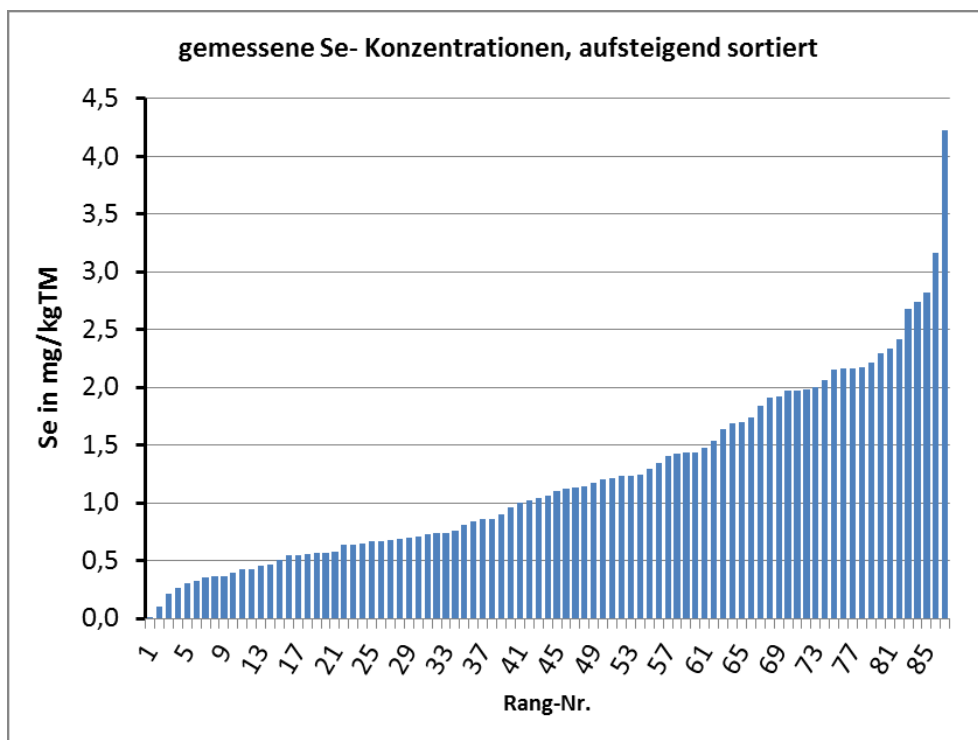


Abbildung 16: Gemessene Se-Konzentrationen (aufsteigend sortiert)

Ein Vergleich der im Rahmen dieser Arbeit gemessenen Konzentrationen mit den in Tabelle 1 angegebenen Bedarfswerten aus der Literatur zeigt auch, dass die bei den einzelnen Elementen gemessenen Minima jeweils eine Unterschreitung der empfohlenen Konzentrationen darstellen.



Einen Überblick über eine mögliche Häufung von extrem niedrigen Spurenelementkonzentrationen gibt Abbildung 17. Dort sind die gemessenen Konzentrationen des jeweiligen Spurenelements in ihrer relativen Ordnung farblich gekennzeichnet. In jeder Spalte ist die Zelle mit dem höchsten Wert grün, die Zelle mit dem niedrigsten Wert rot hinterlegt. Die farblichen Übergänge verlaufen über gelb. Man kann aus dieser Darstellung bei Betrachtung der Zeilen relativ schnell Fermenterproben identifizieren, bei denen eine Häufung von (relativ im Untersuchungsfeld) niedrigen Spurenelementkonzentrationen auftritt. Beispiele hierfür sind in der Abbildung mit roter Umrandung hervorgehoben. Aus der Verteilung der Farbwerte innerhalb der Spalten kann geschlossen werden, dass viele der untersuchten Fermenterproben eine (wiederum relativ im Untersuchungsfeld) niedrige Ni-Konzentration aufweisen, während in der Spalte Co viele Proben mit grünem Hintergrund, also vergleichsweise hoher Konzentration, erkennbar sind.

	mg/kg in TM (ppm) (0 bedeutet unter NWG)									
Proben Bez.	Cu	Ni	Zn	Fe	Bor	Co	Mn	Mo	Se	W
002-09	241	10,5	549	1463	53	2,79	432	4,84	1,74	3,30
003-09	68	7,2	174	3459	21	1,36	207	3,82	0,31	1,03
004-09	159	10,5	1956	4624	44	4,93	832	4,78	1,98	11,62
005-09	53	8,7	198	2359	23	1,92	340	3,23	0,37	1,15
006-09	98	5,8	215	3925	27	1,86	340	2,97	0,57	1,25
007-09	231	17,8	428	2510	21	1,35	479	3,54	0,47	2,55
010-09	92	6,5	390	1037	25	2,27	214	4,00	0,76	2,41
011-09	185	6,0	687	1006	42	2,03	327	4,38	1,12	3,87
016-09	213	7,8	167	2371	28	1,63	248	4,33	0,55	0,91
017-09	77	7,5	334	1840	38	1,55	394	3,58	1,13	1,85
020-09	337	11,9	495	2066	51	3,97	466	5,49	1,25	2,71
021-09	100	6,5	341	1708	41	1,57	392	3,59	1,14	1,96
022-09	3024	39,0	386	2063	69	2,44	355	4,00	1,97	2,12
023-09	58	14,6	217	2142	29	1,93	393	4,16	1,06	1,21
025-09	18	3,7	127	1505	13	0,40	286	2,10	0,58	0,70
028-09	129	10,0	343	5688	22	1,95	734	3,65	0,46	2,24
029-09	135	9,9	366	5001	24	1,91	597	3,74	0,86	2,40
030-09	168	10,5	185	1718	30	1,14	272	4,48	0,64	1,20
031-09	39	12,2	141	1865	23	0,95	270	2,98	0,33	0,92
032-09	48	16,2	210	1873	23	3,11	344	5,20	0,71	1,39
033-09	273	13,4	276	7789	32	3,00	556	4,32	1,24	2,02
040-09	157	25,7	380	1246	39	1,55	255	2,90	1,02	2,41
059-09	31	8,2	117	2501	13	0,66	167	2,63	0,23	0,82
073-09	32	10,2	150	2071	19	1,51	274	5,23	0,56	1,15
074-09	23	9,6	127	2822	15	1,73	284	4,02	0,68	1,09
078-09	24	11,3	82	923	14	7,23	100	4,53	2,16	0,71
079-09	32	6,2	86	897	15	6,77	102	3,87	2,00	0,73
081-09	37	13,2	158	1701	21	2,30	241	4,95	0,67	1,26
082-09	36	12,5	159	1596	22	2,33	243	4,70	0,70	1,30
084-09	23	2,5	101	1043	12	6,46	115	3,25	1,64	0,84
085-09	19	5,0	120	1483	14	1,14	256	2,64	0,43	0,90
115-09	16	4,5	110	963	16	0,90	209	2,04	0,40	0,90
116-09	24	3,6	110	1413	14	8,65	130	3,39	2,30	0,83
188-09	28	2,7	124	1512	13	9,27	133	4,27	2,82	1,20
197-09	25	2,6	106	1298	13	7,26	119	3,73	2,18	1,03
199-09	116	4,9	183	3952	23	2,28	396	2,29	0,74	2,90
204-09	24	2,4	104	1192	13	6,42	122	3,21	1,70	0,95
221-09	16	1,6	71	1413	8	0,45	85	2,05	0,10	1,20
222-09	117	4,0	267	2185	25	1,82	271	3,86	1,00	1,64
224-09	27	2,8	115	1293	17	6,07	134	3,54	1,69	1,00
225-09	318	5,8	395	2666	30	2,66	387	3,10	1,84	2,04
226-09	24	2,6	110	1180	18	8,86	138	3,71	2,68	0,94
237-09	25	9,5	141	1837	21	2,12	220	3,97	0,69	0,80
238-09	23	10,4	145	1780	22	1,82	228	4,29	0,67	0,73
239-09	22	4,8	94	1007	19	1,48	125	3,23	0,36	0,40
251-09	24	2,9	119	1094	23	7,19	128	3,64	2,17	0,34
256-09	24	2,6	116	1127	23	5,74	131	3,61	1,92	0,42
262-09	24	2,2	106	850	19	4,61	121	3,41	1,44	0,16
289-09	22	1,9	105	653	17	6,47	113	2,61	2,22	0,24
005-10	24	2,0	128	883	19	6,05	134	3,46	1,54	0,29
006-10	24	4,7	197	7731	19	5,54	179	3,11	1,17	0,81
013-10	26	2,1	142	1080	20	8,81	141	4,14	2,42	0,36
027-10	25	2,0	136	1130	20	6,85	142	3,98	1,98	0,23
043-10	26	11,9	131	2013	23	2,26	211	4,64	0,55	0,60
044-10	24	1,9	126	1106	18	5,31	130	3,66	1,48	0,29
049-10	29	2,7	140	1273	24	9,77	214	2,87	2,34	0,43
050-10	30	2,9	145	1551	28	7,05	240	7,02	1,30	0,84
067-10	22	1,6	122	933	16	10,73	113	4,11	2,48	0,35
069-10	25	2,3	138	1181	20	12,92	132	4,74	2,63	0,49
089-10	85	3,7	178	3187	22	1,20	304	1,36	0,64	0,83

Abbildung 17: Darstellung der relativen Verhältnisse der Spurenelementkonzentrationen

Entsprechend der Zielsetzung der Arbeit soll geprüft werden, ob zwischen den Konzentrationen der einzelnen Spurenelemente und der gemessenen biologischen Aktivität statistisch signifikante Zusammenhänge bestehen. Die Anwendbarkeit der meisten statistischen Tests setzt hierfür das Vorliegen einer Normalverteilung oder die Kenntnis der Art der Verteilung der zu untersuchenden Variablen voraus. [79] Daher erfolgt zunächst die Untersuchung der gemessenen Spurenelementkonzentrationen auf Vorliegen einer Normalverteilung.

Die Prüfung erfolgte unter Anwendung der Statistik-Software Mynstat. [73] Als Testverfahren wurden der Anpassungstest nach SHAPIRO-WILK (S-W) sowie nach KOLMOGOROV-SMIRNOV (K-S) durchgeführt. Für die Signifikanzprüfung der zweiseitigen Fragestellung wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha = 0,05$  gewählt. Das Testergebnis des K-S-Tests wird mit einem Schwellenwert  $d_\alpha$  verglichen, welcher vom Stichprobenumfang  $n$  und dem gewählten Signifikanzniveau  $\alpha$  abhängt. Für einen Stichprobenumfang  $n > 40$  und  $\alpha = 0,05$  gilt: [79]

$$d_\alpha = 1,36 \cdot n^{-0,5} \quad \text{Gl. 13}$$

Im vorliegenden Fall beträgt der Schwellenwert  $d_\alpha = 0,145$ .

Beim S-W-Test wird durch die Software direkt die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  angegeben, die Annahme des Vorliegens einer Normalverteilung kann demnach bei  $p > \alpha$  aufrechterhalten werden.

Die Ergebnisse der Anpassungstests sowie die Annahme oder Nichtannahme des Vorliegens einer Normalverteilung sind in Tabelle 12 zusammengefasst. Die Testergebnisse zeigen, dass lediglich bei Mo davon ausgegangen werden kann, dass die gemessenen Konzentrationen normalverteilt vorliegen, bei Fe, B, Mn und Se hängt die Annahme oder Nichtannahme einer Normalverteilung vom Testverfahren ab. Insgesamt kann für das Untersuchungsfeld festgestellt werden, dass die generelle Annahme des Vorliegens normalverteilter Werte für die Spurenelementkonzentrationen nicht gerechtfertigt ist.

Tabelle 12: Ergebnisse der Anpassungstests auf Normalverteilung ( $n = 87$ ,  $\alpha = 0,05$ )

	K-S-Test ( $d_{\alpha} = 0,146$ )		S-W-Test	
	$d_{\max}$	Annahme n-Verteilung (J/N)?	p	Annahme n-Verteilung (J/N)?
<b>Cu</b>	0,372	N	0,00	N
<b>Ni</b>	0,148	N	0,00	N
<b>Zn</b>	0,238	N	0,00	N
<b>Fe</b>	0,226	N	0,960	J
<b>B</b>	0,162	N	0,179	J
<b>Co</b>	0,162	N	0,001	N
<b>Mn</b>	0,108	J	0,008	N
<b>Mo</b>	0,051	J	0,68	J
<b>Se</b>	0,126	J	0,00	N
<b>W</b>	0,259	N	0,00	N

Die Ergebnisse der Spurenelementanalytik lassen sich in folgenden Punkten zusammenfassen:

1. Hinsichtlich der gemessenen Konzentrationsbereiche ist eine Einteilung in zwei Gruppen möglich. Der gemessene Konzentrationsbereich der Elemente Fe, Zn und Cu liegt um  $1.000 \text{ mg/kg}_{\text{TM}}$ , bei Ni, Co, B, Mo, Se und W liegen die Konzentrationen mit  $< 100 \text{ mg/kg}_{\text{TM}}$  um eine Größenordnung niedriger.
2. Bei Cu, Zn und Fe liegen viele Extremwerte im oberen Bereich vor, die den Mittelwert entsprechend beeinflussen.
3. Für alle untersuchten Elemente gilt, dass die jeweils gemessene Minimalkonzentration eine Unterschreitung der in Tabelle 1 angegebenen Bedarfs-  
werte darstellt.
4. Die gemessenen Konzentrationen zeigen keine Normalverteilung.

#### **4.3. Zusammenhang zwischen Spurenelementversorgung und biologischer Aktivität**

##### **4.3.1. Korrelationsanalyse**

Zu Beginn dieser Arbeit wurde die These formuliert, dass ein nachweisbarer Zusammenhang zwischen der Leistungsfähigkeit der Fermenterbiologie und den im Fermenter messbaren Spurenelementkonzentrationen existiert. Auf Basis der vorliegenden Messdaten sollen daher mögliche Korrelationen zwischen der biologischen Abbauleistung, ausgedrückt durch die Parameter  $t_{50}$  oder  $t_{33}$ , und der Versorgung mit essentiellen Spurenelementen untersucht werden.

Zunächst ist festzustellen, dass dieser Zusammenhang nicht notwendigerweise durch eine stetige Funktion beschreibbar sein muss. Die Gründe dafür liegen in der biochemischen Funktion der Spurenelemente (siehe hierzu auch Kapitel 2.1). Ein vollständiges Fehlen der betrachteten Spurenelemente führt dazu, dass bestimmte Enzyme nicht gebildet werden und in der Folge wichtige Reaktionen

der biochemischen Abbaukette nicht ablaufen können. Es tritt eine Prozesshemmung ein, die sich z.B. in einer sehr niedrigen biologischen Abbauleistung äußert. Sobald die Versorgung auf einem bestimmten Niveau (gekennzeichnet durch die mindestens erforderliche Konzentration  $c_{\min}$ ) gewährleistet ist, sollte diese Hemmung nicht mehr vorhanden sein. Die biologische Abbauleistung steigt sprunghaft (optimale Konzentration  $c_{\text{opt}}$ ). Eine weitere Erhöhung der Spurenelementkonzentration bewirkt jedoch in der Regel keine weitere Steigerung der biologischen Abbauleistung, da nunmehr andere Faktoren, wie z.B. die Substratversorgung, limitierend wirken. Ab einer oberen Grenzkonzentration  $c_{\max}$  treten schließlich bei einigen essentiellen Spurenelementen inhibierende Effekte auf, wobei diese Konzentrationen im praktischen Anlagenbetrieb oft nicht auftreten. [30], [61] Der zu erwartende qualitative Zusammenhang zwischen Spurenelementkonzentration und biologischer Abbauleistung ist in Abbildung 18 skizziert.

Hinzu kommt, dass weder die gemessenen Spurenelementkonzentrationen noch die Werte für  $t_{33}$  normalverteilt vorliegen (siehe Kapitel 4.1.2 und 4.2). Die Untersuchung von Zusammenhängen mit Hilfe des Korrelationskoeffizienten nach PEARSON führt also nicht zu sinnvollen Aussagen.

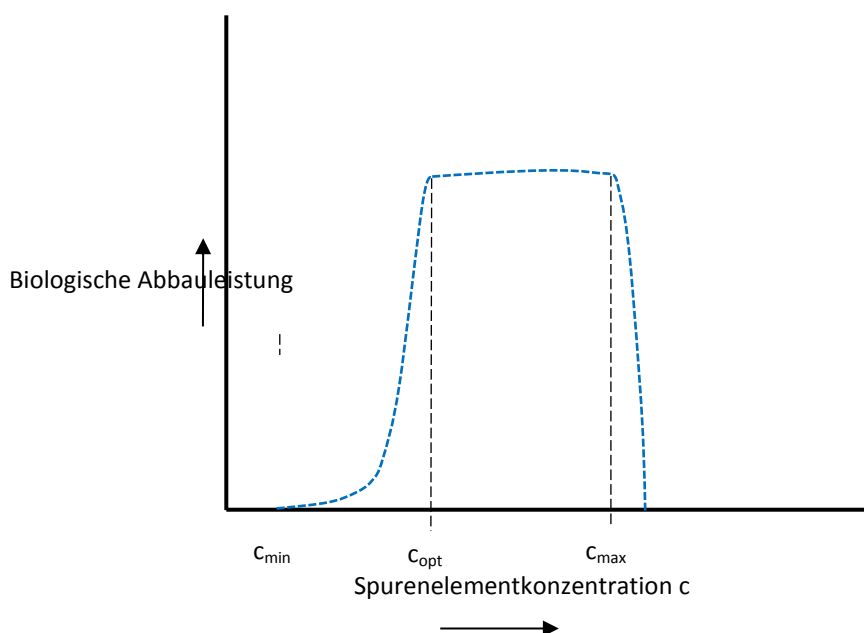


Abbildung 18: Qualitativer Zusammenhang zwischen Spurenelementkonzentration und biologischer Aktivität

Die Untersuchung der Frage, ob ein genereller Zusammenhang zwischen der biologischen Abbauleistung und der Konzentration einzelner Spurenelemente besteht, kann jedoch auf ordinalskaliertem Niveau erfolgen. Der Rangkorrelationskoeffizient nach SPEARMAN ( $r_s$ ) ist für die Darstellung beliebiger Zusammenhänge von zwei Variablen geeignet, weil nur die Rangreihenfolge der Werte und nicht deren Höhe berücksichtigt wird. Aus diesem Grund ist  $r_s$  auch robust gegenüber Ausreißern und Extremwerten. [79] Der Wertebereich liegt

zwischen  $-1 \leq r_s \leq 1$ , wobei für die Bewertung der Stärke des Zusammenhangs eine Differenzierung nach Tabelle 13 erfolgt. [79]

Tabelle 13: Bewertung statistischer Zusammenhänge mittels des Korrelationskoeffizienten nach PEARSON

Betrag von $r_s$	Bewertung des Zusammenhangs
$0 \leq r_s \leq 0,1$	kein Zusammenhang
$0,1 \leq r_s \leq 0,3$	geringer Zusammenhang
$0,3 \leq r_s \leq 0,5$	mittlerer Zusammenhang
$0,5 \leq r_s \leq 0,7$	starker Zusammenhang
$0,7 \leq r_s < 1$	sehr starker Zusammenhang

Der Rangkorrelationskoeffizient  $r_s$  kann ab einem Umfang von  $n = 5$  Elementen nach Gl. 14 berechnet werden. Dazu sind die Elemente der zu untersuchenden Parameter zunächst paarweise zu ordnen und nach einem der beiden Parameter in aufsteigender Reihenfolge zu sortieren. Es ergibt sich für jedes Element ein Rangplatz innerhalb dieser Reihung.

$$r_s = 1 - \frac{6 \cdot \sum_{i=1}^n d_i^2}{n \cdot (n^2 - 1)} \quad \text{Gl. 14}$$

mit:

- $r_s$ : Rangkorrelationskoeffizient nach SPEARMAN  
 $d_i$ : Rangplatzdifferenz der  $i$ -ten Untersuchungseinheit  
 $n$ : Anzahl der Untersuchungseinheiten

In Tabelle 14 ist das Ergebnis der Korrelationsanalyse dargestellt. Für alle untersuchten Spurenelemente bis auf Mo kann ein mindestens geringer Zusammenhang zwischen der Spurenelementkonzentration und dem Parameter  $t_{33}$  festgestellt werden. Eine starke Korrelation besteht nach dieser ersten Auswertung zwischen  $t_{33}$  und Mn sowie Cu. Zwischen  $t_{33}$  und Mo konnte kein Zusammenhang nachgewiesen werden.

Tabelle 14: Korrelationsmatrix für  $t_{33}$  und Spurenelementkonzentration

	$t_{33}$	W	Se	Mo	Mn	Co	B	Fe	Zn	Ni	Cu
$t_{33}$	1,00										
W	-0,38	1,00									
Se	0,18	-0,20	1,00								
Mo	-0,03	0,26	-0,03	1,00							
Mn	-0,54	0,70	-0,26	0,24	1,00						
Co	0,22	-0,29	0,82	0,06	-0,34	1,00					
B	-0,40	0,55	-0,07	0,35	0,71	-0,23	1,00				
Fe	-0,45	0,56	-0,35	0,16	0,70	-0,27	0,44	1,00			
Zn	-0,44	0,73	-0,20	0,28	0,81	-0,32	0,80	0,57	1,00		
Ni	-0,37	0,63	-0,33	0,53	0,64	-0,31	0,52	0,51	0,61	1,00	
Cu	-0,51	0,67	-0,20	0,26	0,74	-0,30	0,82	0,54	0,85	0,59	1,00

Tabelle 14 kann weiterhin entnommen werden, dass zwischen der Spurenelementkonzentration und  $t_{33}$  in der Regel ein negativer Zusammenhang besteht, dass also  $t_{33}$  mit zunehmender Spurenelementkonzentration sinkt. Dieses Verhalten war so auch erwartet worden, da niedrige  $t_{33}$ -Werte für einen schnellen Substratumsatz und damit eine hohe biologische Aktivität stehen.

Eine Ausnahme bilden in dieser Reihe Se und Co, bei denen ein geringer, aber positiver Zusammenhang festgestellt wurde. Betrachtet man die Korrelationen der einzelnen Elemente untereinander, so ist auffällig, dass hier in der Regel positive Zusammenhänge bestehen. So ist beispielsweise eine höhere Ni-Konzentration tendenziell auch mit einer höheren Konzentration aller anderen Spurenelemente verbunden. Lediglich Co und Se bilden hier wiederum Ausnahmen, und zwar bezüglich nahezu aller anderen Komponenten. Das bedeutet auf das Beispiel Ni bezogen, bei Fermenterproben mit niedriger Ni-Konzentration wurden relativ hohe Konzentrationen an Se und Co gemessen.

Die Ursachen hierfür können an dieser Stelle nicht vollständig geklärt werden. Es ist jedoch anzunehmen, dass Se und Co aufgrund ihrer gut belegten Bedeutung für anaerobe Mikroorganismen häufig Bestandteil von kommerziell verfügbaren Hilfsstoffen zur Prozessstabilisierung sind. Der Einsatz derartiger Hilfsstoffe ist auch in landwirtschaftlichen BGA sehr verbreitet, wurde aber im Rahmen dieser Arbeit nicht bei den Betreibern abgefragt. Die sehr starke Korrelation zwischen Co und Se spricht ebenfalls dafür, dass beide Elemente durch Additive in die Fermenterproben gebracht wurden.

Auch für die Spurenelementversorgung gilt der als LIEBIG'sches Minimumsgesetz bekannte Grundsatz, dass die jeweils knappste Ressource limitierend für das Gesamtsystem wirkt. Das bedeutet, dass eine Unterversorgung bei nur einem

einzelnen essentiellen Spurenelement bereits zu Mangelercheinungen führt, und zwar unabhängig vom Versorgungsstatus bei allen anderen Komponenten. Auch Mangelercheinungen, die überhaupt nicht im Zusammenhang mit der Spurenelementversorgung stehen, bewirken demnach eine verminderte biologische Aktivität. Für die gefundene schwach positive Korrelation zwischen Se, Co und  $t_{33}$  kann das Wirken dieses Minimumprinzips angenommen werden: trotz offensichtlich ausreichender Versorgung mit Se und Co wird ein verzögerter Substratumsatz gemessen, weil andere Faktoren, eventuell andere essentielle Spurenelemente, limitierend wirken. Bei Se kann zusätzlich die bereits in 2.3 dargestellte niedrige Obergrenze, ab welcher eine Hemmwirkung eintreten kann, als Ursache für das gegenläufige Verhalten vermutet werden.

Die einzelnen Spurenelemente zeigen untereinander unterschiedlich stark ausgeprägte Korrelationen, und zwar wiederum mit Ausnahme von Co und Se durchweg positive. So besteht ein sehr starker Zusammenhang zwischen Cu und Zn sowie zwischen Fe und Mn.

Auch der Zusammenhang zwischen  $t_{33}$  und anderen analytisch erfassten Parametern wurde unter Anwendung des SPEARMAN-Korrelationskoeffizienten untersucht, um mögliche Hemmeffekte, die nicht oder nicht direkt mit der Spurenelementversorgung in Zusammenhang stehen, zu berücksichtigen. Dies betrifft insbesondere Ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) und Schwefel.

Die hemmende Wirkung von Ammonium auf den Gesamtprozess der Biogasbildung kann schon bei niedrigen Konzentrationen von 0,25 %<sub>FM</sub> im Fermenter einsetzen, jedoch sind die methanogenen Mikroorganismen diesbezüglich recht anpassungsfähig. So konnte in Versuchen gezeigt werden, dass bei langsamer Steigerung selbst Konzentrationen von bis zu 4 %<sub>FM</sub> ohne negative Auswirkungen auf die Biogasausbeute bleiben können. [80] Bei den untersuchten Fermenterproben wurden Ammonium-Konzentrationen von 0,14 bis 0,47 %<sub>FM</sub> gemessen, das Auftreten von entsprechenden Hemmungen ist also bei einzelnen Proben nicht ausgeschlossen. Das Ammoniak-Ammonium-Gleichgewicht ist stark temperatur- und pH-abhängig. Der pH-Wert wurde daher mit in die Korrelationsmatrix aufgenommen. Außerdem kann vermutet werden, dass auch die Bioverfügbarkeit von Spurenelementen mit dem pH-Wert in Zusammenhang steht, da niedrige pH-Werte das Dissoziationsgleichgewicht zu freien Ionen hin verschieben.

Schwefel wirkt in Form von gelöstem Schwefelwasserstoff ( $\text{H}_2\text{S}$ ) inhibierend auf den Biogasprozess. [5] Der Schwefelgehalt der Fermenterprobe kann daher als Indikator für mögliche Hemmungen angesehen werden. Zudem hat S zu den meisten Metallen eine hohe Bindungsaffinität. Hohe S-Gehalte sind also ein Indiz dafür, dass die Spurenelemente nicht in bioverfügbarer Form vorhanden sind sondern zum großen Teil als schwerlösliche Sulfite vorliegen.



Schließlich sind noch der Trockenmasseanteil TM und der Quotient FOS/TAC in die Korrelationsanalyse aufgenommen worden. Im praktischen Anlagenbetrieb wird dieser häufig als Leitindikator für die Prozessstabilität verwendet und hat sich hier vielfach bewährt. [65] Es ist daher zu erwarten, dass auch zwischen diesem Stabilitätsindikator und  $t_{33}$  ein Zusammenhang besteht.

Tabelle 15: Korrelationsmatrix für  $t_{33}$ , N, S, pH, FOS/TAC und TM

	$t_{33}$	S	NH <sub>4</sub> -N	gesamt-N	FOS/TAC	pH	TM
$t_{33}$	1						
S	-0,65	1					
NH <sub>4</sub> -N	0,21	-0,23	1				
gesamt-N	-0,30	0,39	0,16	1			
FOS/TAC	0,66	-0,71	-0,03	-0,40	1		
pH	-0,24	0,27	0,28	0,20	-0,58	1	
TM	0,32	-0,69	0,35	-0,60	0,31	0,06	1

Erwartungsgemäß ergibt sich ein starker Zusammenhang zwischen dem Quotienten FOS/TAC und  $t_{33}$ . Obwohl die Anwendung des FOS/TAC-Wertes als Stabilitätsparameter auf rein empirischen Beobachtungen beruht, kann dies als zusätzliche Bestätigung der Eignung von  $t_{33}$  zur Bewertung der biologischen Abbauleistung im Fermenter gewertet werden.

Auch S und  $t_{33}$  zeigen eine starke Korrelation. Der negative Wert von  $r_s$  ist damit zu erklären, dass S aus der getrockneten Fermenterprobe bestimmt wird. Höhere Schwefelgehalte bedeuten demzufolge, dass der Anteil von gelöstem H<sub>2</sub>S niedrig ist. In diesem Fall liegt S vor allem als Sulfit, aber auch als elementarer Schwefel vor. Die Korrelation zwischen  $t_{33}$  und den N-Gehalten, in der Tabelle noch differenziert nach gesamt-N und NH<sub>4</sub>-N, ist gering. Insgesamt ist festzustellen, dass die in Tabelle 15 betrachteten Prozessparameter teilweise einen ebenso großen Zusammenhang zur biologischen Abbauleistung zeigen, wie die untersuchten Spurenelemente. Bei der weiteren Datenanalyse ist dies zu berücksichtigen.

#### 4.3.2. Ableitung von Zielkonzentrationen

Die oben gefundenen Korrelationen zeigen zwar, dass es zwischen einigen der analysierten Spurenelemente und  $t_{33}$  einen statistischen Zusammenhang gibt, es können aus diesen Ergebnissen jedoch keine Ziel- oder Richtkonzentrationen, die in Biogasfermentern anzustreben sind, abgeleitet werden.

Der zu erwartende qualitative Zusammenhang zwischen der biologischen Abbauleistung und der Spurenelementkonzentration wurde bereits in Abbildung 18 skizziert. Bei der Betrachtung der tatsächlich gemessenen Daten zeigt sich, dass die Streuung der Wertepaare um die erwartete Kurve zum Teil erheblich ist. Für

das Beispiel Zn sind die gemessenen Konzentrationen und die zugehörigen Werte für  $t_{33}$  in Abbildung 19 dargestellt. Es ist erkennbar, dass einige Fermenterproben trotz hoher (also wahrscheinlich ausreichender) Zn-Konzentrationen hohe Werte für  $t_{33}$ , also eine niedrige Abbauaktivität aufweisen.

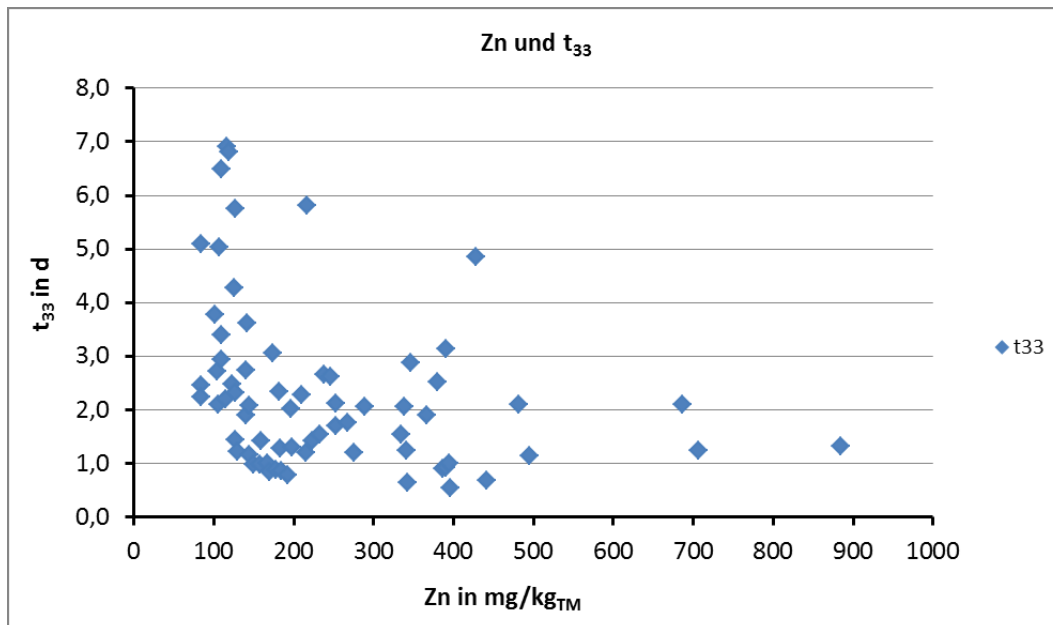


Abbildung 19: Zn-Konzentration und  $t_{33}$  (n = 69 Fermenterproben)

Diese Fermenterproben sind durch eine Lage rechts oberhalb in der Punktwolke gekennzeichnet. Ein verlangsamter Substratabbau kann vielfältige Ursachen haben, die nicht mit der Spurenelementversorgung in Zusammenhang stehen. Sofern diese Ursachen eindeutig identifiziert werden können, was jedoch in den wenigsten Fällen sicher möglich ist, kann die betreffende Fermenterprobe von der weiteren Auswertung ausgeschlossen werden. Größere Schwierigkeiten bereitet die Beurteilung von Proben, die in Abbildung 19 links unten in der Punktwolke liegen. Diese Proben sind durch eine hohe Abbauaktivität trotz einer sehr niedrigen Zn-Konzentration gekennzeichnet. Ein Erklärungsansatz hierfür liegt in der Bioverfügbarkeit. Mit der in Kapitel 3.1.3 beschriebenen Analytik wird der Gesamtgehalt des jeweiligen Spurenelements unabhängig von der vorliegenden Bindungsform erfasst. Die Bindungsform beeinflusst jedoch ganz entscheidend die Bioverfügbarkeit und damit die biochemische Wirksamkeit von Spurenelementen. [81]

Das Auftreten von Wertepaaren (c,  $t_{33}$ ) im linken unteren Bereich der Punktwolke kann dahingehend interpretiert werden, dass das jeweilige Spurenelement in der betreffenden Probe in nahezu vollständig bioverfügbarer Form vorliegt. Es gibt bereits Ansätze, die Bioverfügbarkeit mit differenzierten analytischen Verfahren zu beurteilen. Diese sind jedoch noch im Forschungs- bzw. Entwicklungsstadium und können nicht als etablierte Methode angesehen werden. [41], [10], [82] Für die Ableitung von Zielkonzentrationen muss also zunächst unterstellt werden, dass

sich in einem durchschnittlichen Biogasfermenter die Verteilung des bioverfügbaren und nicht bioverfügbaren Anteils des jeweiligen Spurenelements stets etwa gleich verhält.

Für diejenigen Spurenelemente, bei denen ein mindestens schwacher Zusammenhang zwischen der gemessenen Konzentration und  $t_{33}$  festgestellt wurde (vgl. Tabelle 14), können die Zielkonzentrationen basierend auf diesem Zusammenhang ermittelt werden. Die Vorgehensweise wird im Folgenden am Beispiel von Zn ausführlich erläutert.

Für den statistischen Zusammenhang zwischen der gemessenen Zn-Konzentration und  $t_{33}$  wurde ein Korrelationskoeffizient  $r_s = -0,44$  ermittelt, was auf einen deutlichen, aber keinen starken Zusammenhang hinweist. In Abbildung 19 ist zu sehen, dass nur wenige Fermenterproben rechts oberhalb der Punktwolke liegen. Die anzustrebende Zielkonzentration kann als diejenige Konzentration definiert werden, bei deren Unterschreitung eine sprunghafte Abnahme der biologischen Abbauleistung bzw. ein sprunghafter Anstieg des Parameters  $t_{33}$ , beobachtet wird. Die Fermenterproben werden für die weitere Auswertung bezüglich der gemessenen Zn-Konzentration in Klassen eingeteilt. Die Klassenaufteilung hat einen nicht unerheblichen Einfluss auf das weitere Ergebnis, daher sind folgende Punkte zu beachten:

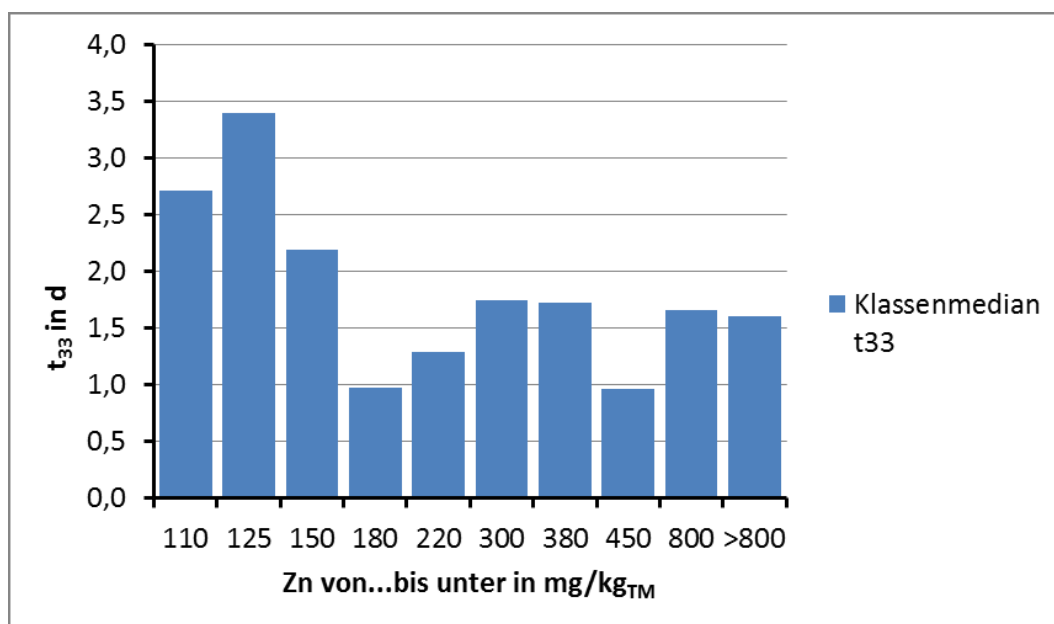
1. Jede Klasse soll mindestens 5, besser 10 Elemente enthalten.
2. Im Bereich des zu erwartenden sprunghaften Anstiegs von  $t_{33}$  soll die Klassenbreite nicht zu groß sein, um eine gewisse Trennschärfe zu gewährleisten.
3. Weit außen liegende Extremwerte (siehe Beispiel Cu in Abbildung 15) sollen die letzte Klasse zahlenmäßig nicht dominieren.

Für Zn ist die gewählte Klasseneinteilung in Tabelle 16 angegeben. Anschließend wird innerhalb jeder Klasse der Median des Parameters  $t_{33}$  bestimmt. Der Median ist bei dieser Analyse dem arithmetischen Mittel vorzuziehen, weil er tolerant gegenüber Extremwerten ist.

Tabelle 16: Klasseneinteilung und Klassenmediane  $t_{33}$  für Zn

Kl. Nr.	Zn in mg/kg <sub>TM</sub>		Anz. Elemente	Klassenmedian $t_{33}$
	von	Bis	n=	d
1	0	< 110	7	2,71
2	110	< 125	7	3,40
3	125	< 150	10	2,19
4	150	< 180	7	0,98
5	180	< 220	9	1,29
6	220	< 300	9	1,75
7	300	< 380	6	1,72
8	380	< 450	8	0,96
9	450	< 800	4	1,66
10	> 800		2	1,60

Man kann nun die Klassen und die ermittelten Klassenmediane in einem Balkendiagramm wie in Abbildung 20 darstellen. Aus dieser Darstellung kann entnommen werden, dass eine Unterschreitung der Zn-Konzentration von 150 mg/kg<sub>TM</sub> mit einem sprunghaften Anstieg von  $t_{33}$  verbunden ist.

Abbildung 20: Klassenmediane  $t_{33}$  für Zn

In diesem Fall umfassen die Klassen, in denen der Sprung stattfindet, ausreichend viele Elemente, so dass eine nochmalige Betrachtung eines Teilintervalls möglich ist. Der Bereich bis zu einer Zn-Konzentration von 250 mg/kg<sub>TM</sub> wurde nochmals in 7 Klassen mit jeweils 3...5 Elementen aufgeteilt und wiederum der Klassenmedian gebildet. Das Ergebnis ist in Abbildung 21 gezeigt.

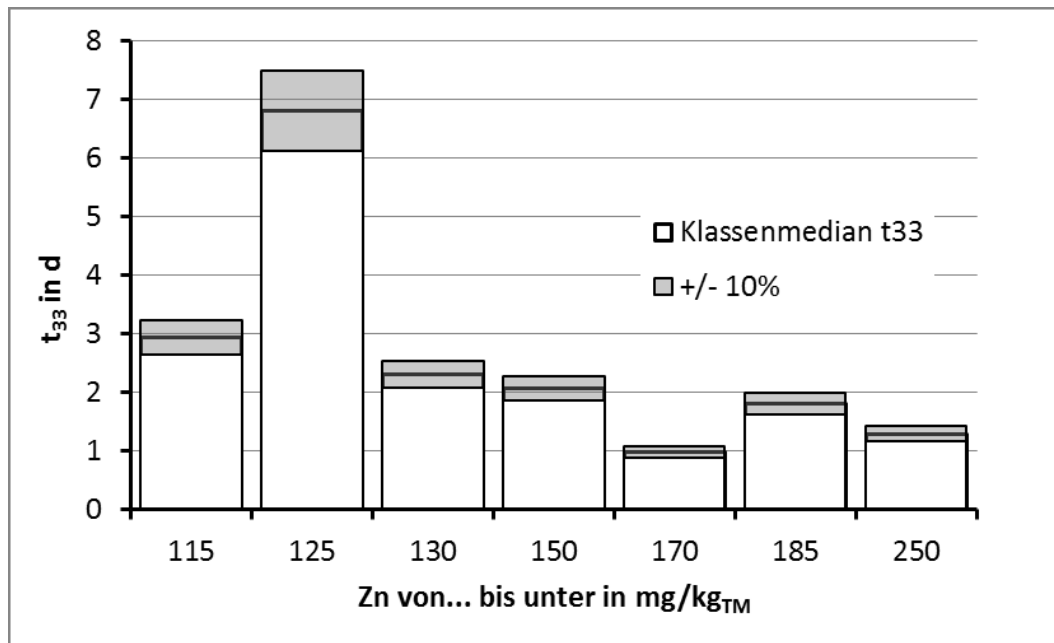


Abbildung 21: Klassenmediane  $t_{33}$  nach Verkleinerung der Klassenbreite im Intervall bis 250 mg/kg<sub>TM</sub>

Es findet ein deutlicher sprunghafter Anstieg von  $t_{33}$  zwischen den Klassen 2 (115 bis < 125 mg/kg<sub>TM</sub>) und 3 (125 bis < 130 mg/kg<sub>TM</sub>) statt. In der Abbildung ist der Bereich  $\pm 10\%$  gekennzeichnet, der im Kapitel 3.2.6 als versuchstypischer Variationskoeffizient ermittelt wurde. Im vorliegenden Fall gibt es zwischen den Klassen 2 und 3 keine Überschneidung dieser Bereiche. In den folgenden Darlegungen wird jeweils die Obergrenze der Klasse, die rechts an den sprunghaften Anstieg grenzt, als Zielkonzentration für das jeweilige Spurenelement definiert. In diesem Fall wird für Zn eine anzustrebende Konzentration von 130 mg/kg<sub>TM</sub> bestimmt. Dass der Median der Klasse 1 vom Minimalwert 84,4 mg/kg<sub>TM</sub> bis < 115 mg/kg<sub>TM</sub> mit 2,94 d wiederum deutlich niedriger liegt, kann in diesem Zusammenhang nur durch den bereits diskutierten Einfluss der Bioverfügbarkeit plausibel erklärt werden.

Auf die gleiche Weise können die Zielkonzentrationen für die weiteren Spurenelemente dargestellt werden.

## Kupfer

Bei der Korrelationsanalyse wurde zwischen der Cu-Konzentration und  $t_{33}$  ein mittlerer bis starker Zusammenhang festgestellt. Für die Klasseneinteilung wurden die bereits erwähnten oberen Extremwerte (vgl. Abbildung 15) nicht berücksichtigt, da sie weit oberhalb sowohl des üblichen als auch des relevanten Konzentrationsbereiches liegen. Bereits die grobe Klasseneinteilung in Abbildung 22 zeigt einen deutlichen Sprung im Konzentrationsbereich 20...25 mg/kg<sub>TM</sub>.

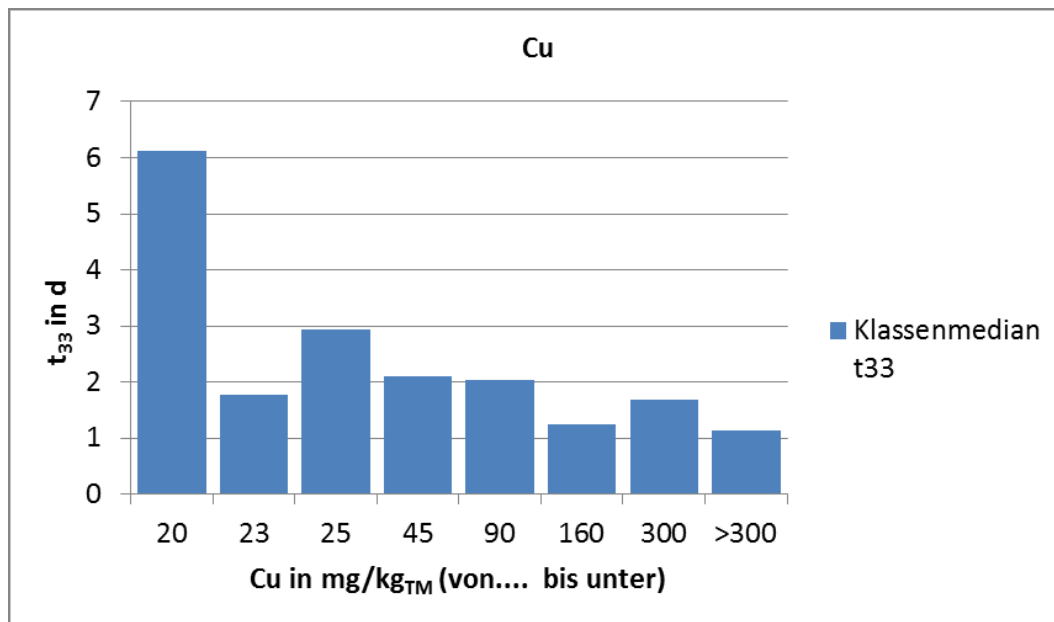


Abbildung 22: Klasseneinteilung und Klassenmediane: Cu

Um diese Ergebnis noch enger einzugrenzen, wurde das Intervall, welches die ersten drei Klassen umfasst, nochmals in vier Klassen mit jeweils 4...9 Elementen aufgeteilt. Das Ergebnis zeigt Abbildung 23. Zwischen der Klasse 1 (bis 22 mg/kg<sub>TM</sub>) und 2 (22 bis < 24 mg/kg<sub>TM</sub>.) findet ein deutlicher und bezüglich der 10%-Intervalle auch signifikanter Anstieg von  $t_{33}$  statt. Bei den drei oberen Klassen überlappen sich die 10%-Bereiche. Die Zielkonzentration für Cu wird dementsprechend mit 24 mg/kg<sub>TM</sub> festgelegt.

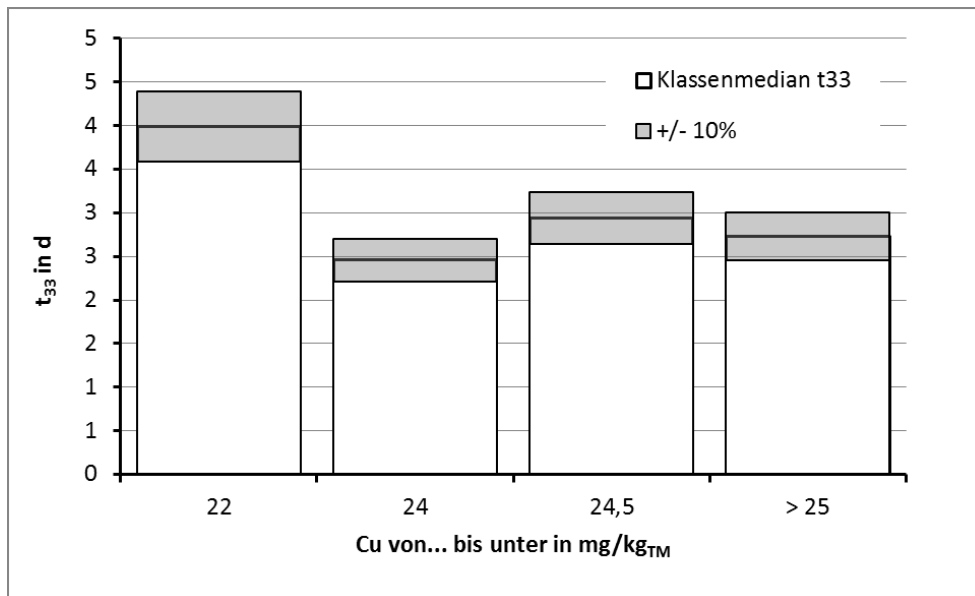


Abbildung 23: Klassenmediane  $t_{33}$  für Cu nach Verkleinerung der Klassenbreite im Intervall bis 25 mg/kg<sub>TM</sub>

## Eisen

Auch bei Fe gilt, was bereits im Kapitel 4.2 für Cu und Zn festgestellt wurde: die gemessenen Konzentrationen erstrecken sich über einen sehr weiten Bereich und liegen in der Größenordnung von  $10^3$  mg/kg<sub>TM</sub>. Zwischen dem größten und dem kleinsten gemessenen Wert liegt der Faktor 13. Es konnte nur eine mäßige Korrelation zwischen  $t_{33}$  und den gemessenen Fe-Konzentrationen festgestellt werden.

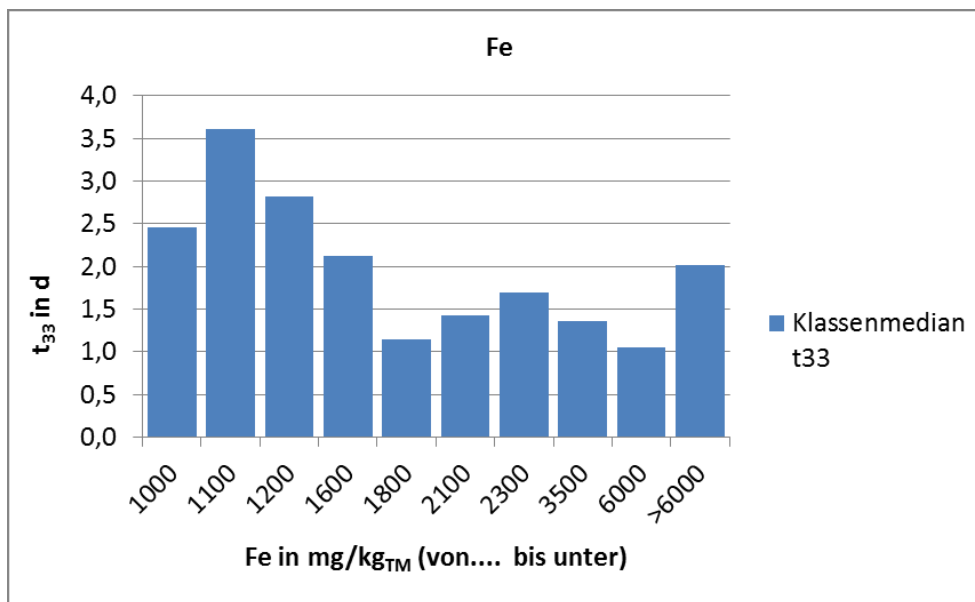


Abbildung 24: Klasseneinteilung und Klassenmediane: Fe

Die in Abbildung 24 dargestellten Klassenbereiche und Klassenmediane zeigen einen stufenweisen Anstieg von  $t_{33}$ , sobald eine Konzentration von 1.600 mg/kg<sub>TM</sub> unterschritten wird. Für die detaillierte Auswertung wurden sechs neue Klassen

gebildet, wobei in der ersten Klasse alle Proben mit einer Fe-Konzentration  $< 1.200 \text{ mg/kg}_{\text{TM}}$  zusammengefasst wurden. Die letzte Klasse umfasst alle Proben mit  $> 2.200 \text{ mg/kg}_{\text{TM}}$ . Die dazwischen liegenden Klassen enthalten jeweils zwischen 5 und 8 Elemente. Das Ergebnis zeigt Abbildung 25. Der sprunghafte Anstieg von  $t_{33}$  findet in dieser Darstellung zwischen Klasse 3 ( $1.400 \text{ bis } < 1.600 \text{ mg/kg}_{\text{TM}}$ ) und Klasse 4 ( $1.600 \text{ bis } < 1.800 \text{ mg/kg}_{\text{TM}}$ ) statt. Die anzustrebende Zielkonzentration für Fe liegt somit bei  $1.800 \text{ mg/kg}_{\text{TM}}$ .

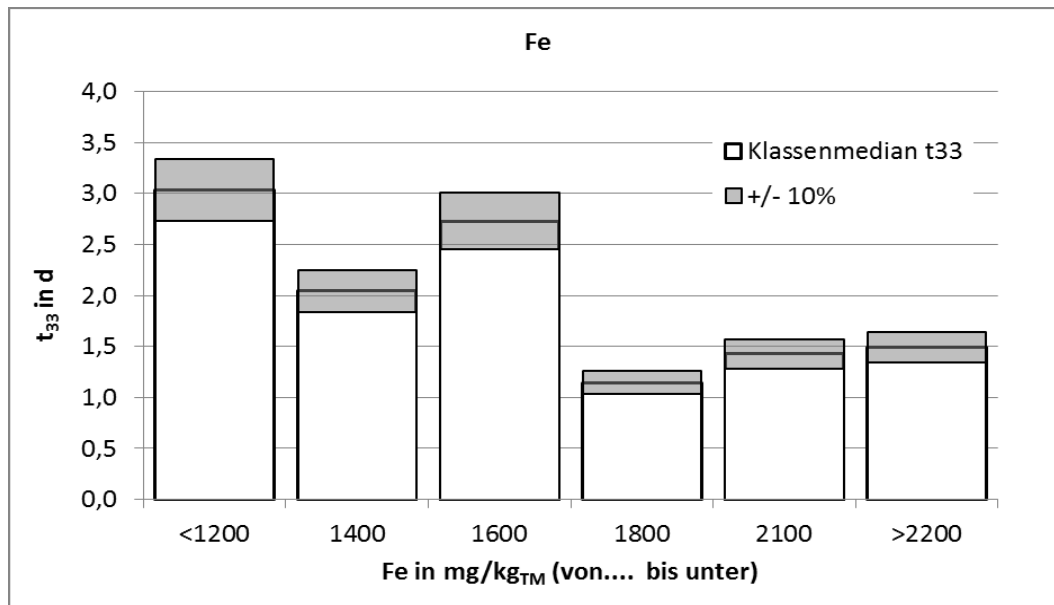


Abbildung 25: Klassenmediane  $t_{33}$  für Fe nach Verkleinerung der Klassenbreite



## Nickel

Die gemessenen Ni-Konzentrationen erstrecken sich mit 1,8...38 mg/kg<sub>TM</sub> über einen vergleichsweise weiten Bereich.

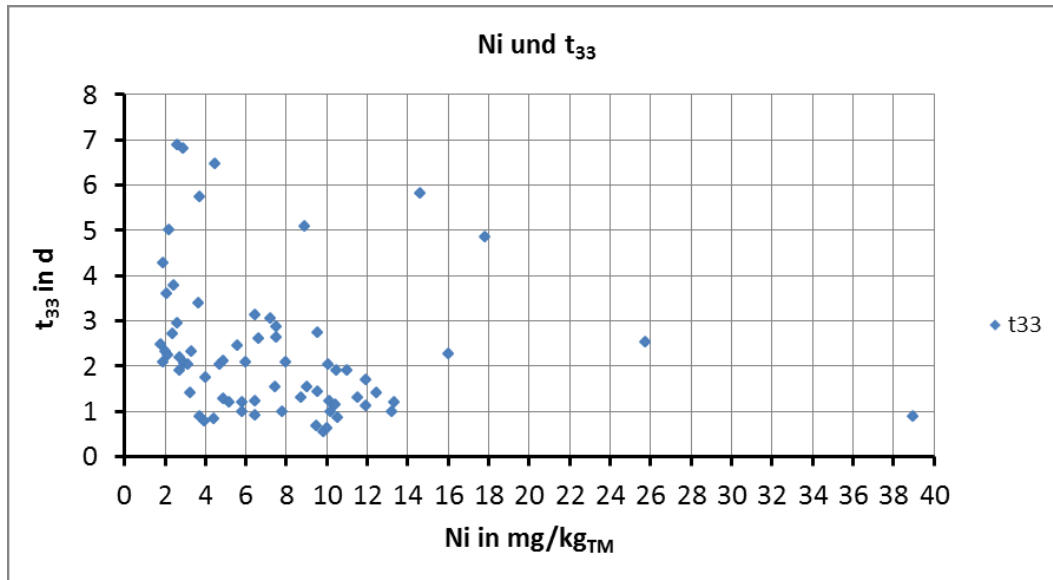


Abbildung 26: Ni- Konzentrationen und  $t_{33}$  (n = 69 Fermenterproben)

Auch bezüglich Ni sind einige Fermenterproben mit verminderter Abbauaktivität trotz hoher Ni-Konzentrationen auffällig (siehe Abbildung 26). Eine generelle Hemmwirkung hin zu höheren Konzentrationen konnte jedoch im Untersuchungsfeld nicht beobachtet werden.

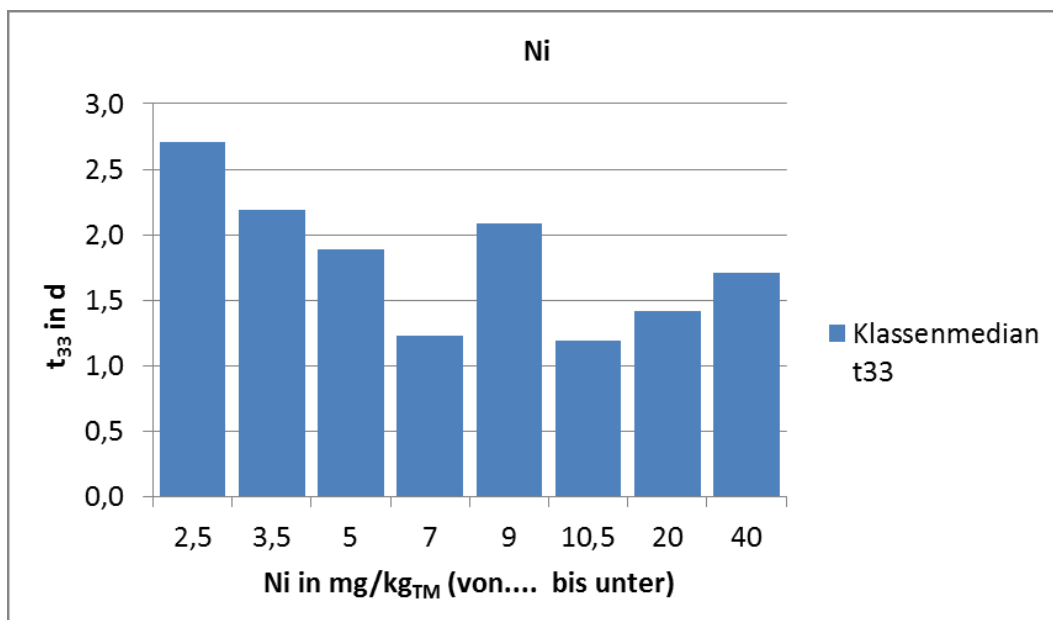


Abbildung 27: Klasseneinteilung und Klassenmediane: Ni

Eine erste Einteilung erfolgte in sieben Klassen mit jeweils 9...10 Elementen. Die Klassen und die dazugehörigen Klassenmediane für  $t_{33}$  sind in Abbildung 27 dargestellt. Es ist erkennbar, dass innerhalb der ersten vier Klassen, also bei Ni-

Konzentrationen unter 7 mg/kg<sub>TM</sub>, ein stetiger Anstieg des Klassenmedians erfolgt. Dementsprechend wurde dieses Intervall nochmals in sechs Klassen unterteilt. Das Ergebnis ist in Abbildung 28 dargestellt.

Der sprunghafte Übergang fällt bei Ni nicht so stark aus wie beispielsweise bei Zn oder Cu, jedoch tritt unterhalb von 3 mg/kg<sub>TM</sub> auch hier ein deutlicher Anstieg des Klassenmedians auf, ohne dass es zu einer Überschneidung der 10-%-Intervalle der benachbarten Klassen kommt. Der Median der Klasse von 5,0...<6,0 mg/kg<sub>TM</sub> liegt zwar ebenfalls deutlich unter dem der links angrenzenden Klasse, jedoch auch unterhalb der rechts angrenzenden. Der Sprung lässt sich mit den gegenüber der Darstellung in Abbildung 27 veränderten Klassengrenzen erklären.

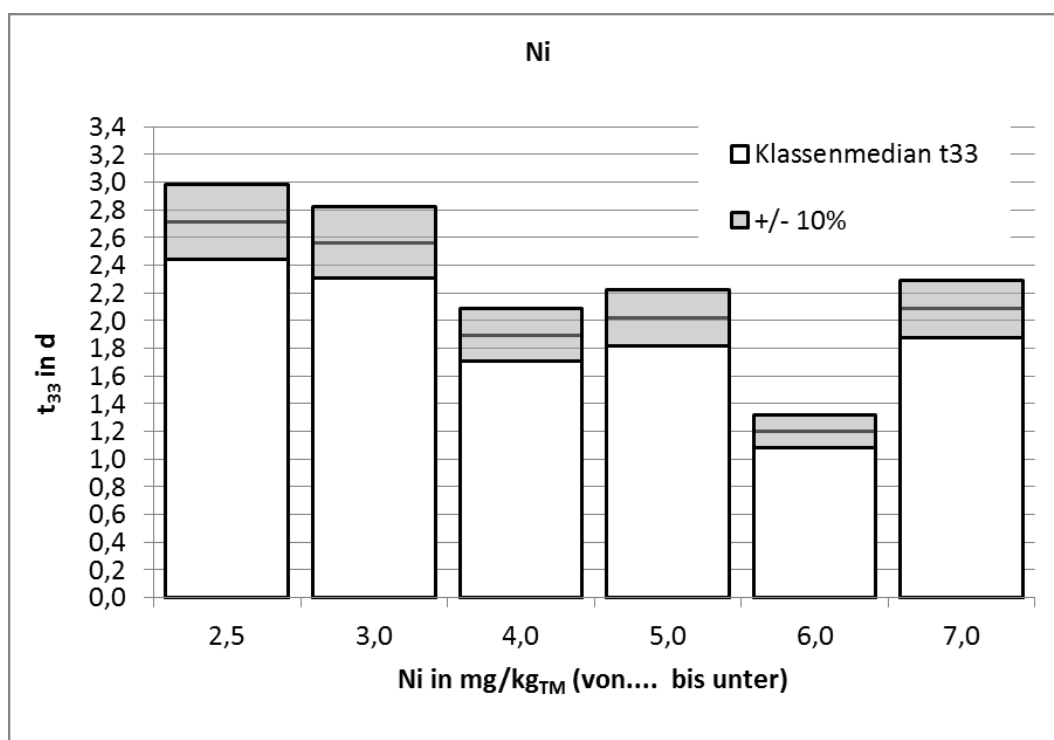


Abbildung 28: Klassenmediane  $t_{33}$  für Ni nach Verkleinerung der Klassenbreite

Entsprechend der oben getroffenen Festlegungen wird für Ni eine Zielkonzentration von 4,0 mg/kg<sub>TM</sub> abgeleitet.

### Molybdän

In Kapitel 4.3.1 konnte keine Korrelation zwischen der Mo-Konzentration und der als  $t_{33}$  gemessenen biologischen Aktivität festgestellt werden. Eine Einteilung in Klassen und die Darstellung der zugehörigen Klassenmediane entsprechend Abbildung 29 lässt dennoch einen zumindest tendenziellen Verlauf erkennen. Bei Unterschreitung der Konzentrationsschwelle von 4,5 mg/kg<sub>TM</sub> ist ein Anstieg des Klassenmedians zu verzeichnen, mit weiter abnehmender Mo-Konzentration nimmt allerdings auch  $t_{33}$  tendenziell wieder ab, und zwar bis auf ein Niveau, das etwa der Klasse von 4,5...< 5 mg/kg<sub>TM</sub> entspricht.

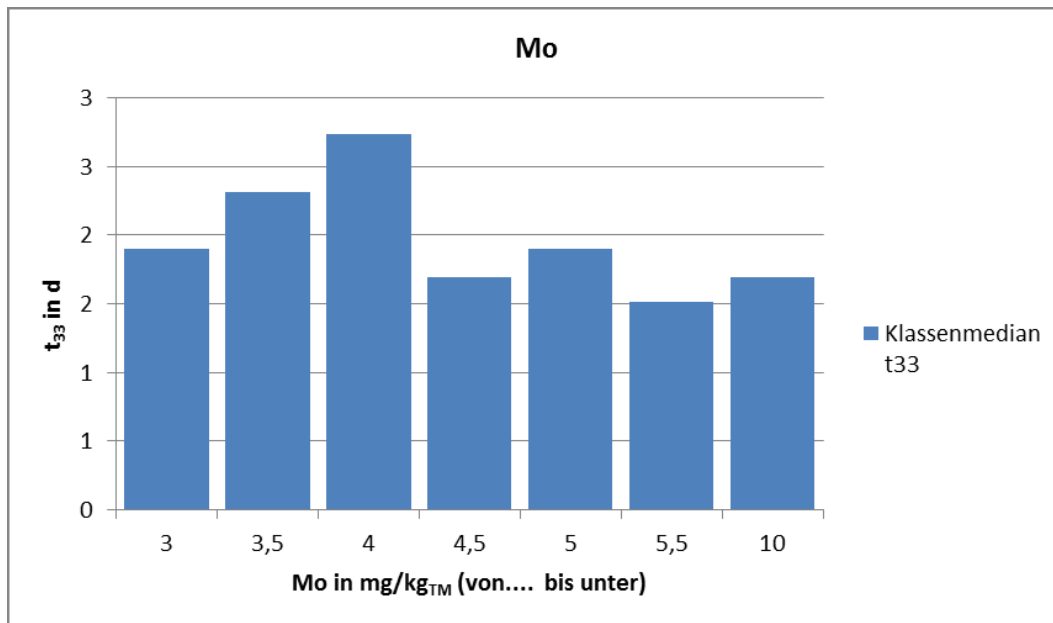


Abbildung 29 : Klasseneinteilung und Klassenmediane: Mo

Das Kriterium für eine feinere Einteilung der Klassen ist in diesem Fall schwer festzulegen, da die gemessenen Mo-Konzentrationen nur wenig streuen. In Tabelle 17 sind der Median sowie die Quartile der Dichtefunktion angegeben. Die Hälfte aller Werte liegt im Intervall 3,03...4,23 mg/kg<sub>TM</sub>, somit wurde dieses Intervall für eine feinere Unterteilung ausgewählt.

Tabelle 17: Quartile und Median der gemessenen Mo-Konzentrationen

1. Quartil	Median	3.Quartil
mg/kg <sub>TM</sub>		
3,03	3,61	4,23

Das Ergebnis ist in Abbildung 30 dargestellt. Es ergibt sich ein ähnliches Bild wie bei Betrachtung des gesamten Wertebereiches: bei Unterschreitung einer bestimmten Mo-Konzentration ist zunächst ein sprunghafter Anstieg von  $t_{33}$  festzustellen, bei noch geringeren Konzentrationen hingegen gehen auch die gemessenen Werte für  $t_{33}$  wieder zurück.

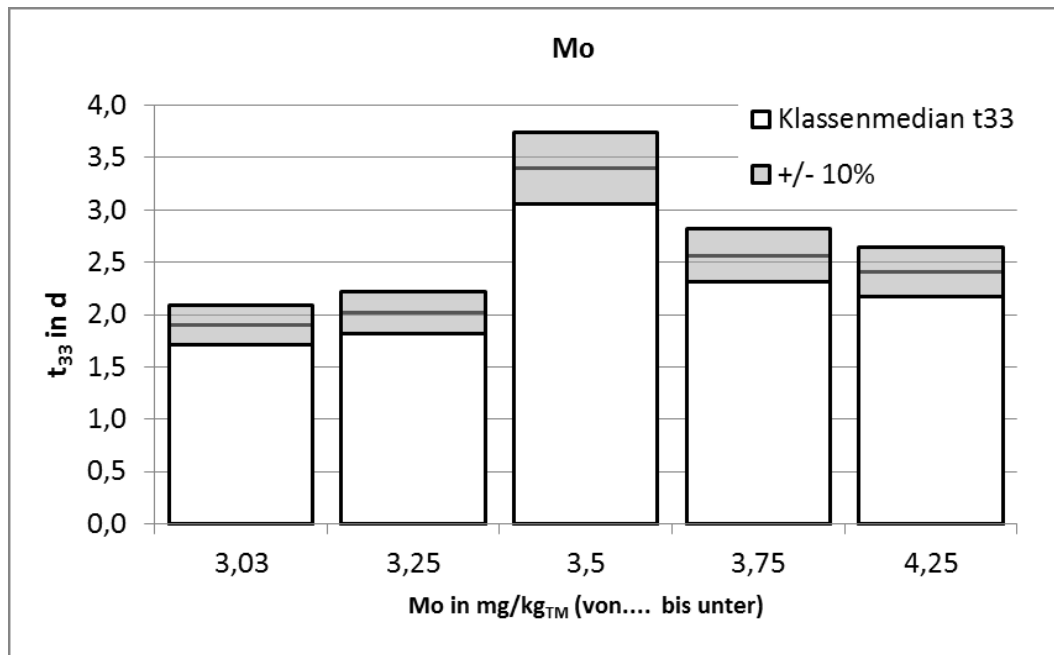


Abbildung 30: Klassenmediane  $t_{33}$  für Mo nach Beschränkung des Intervalls und Verkleinerung der Klassenbreite

Der Anstieg des Klassenmedians bei Unterschreitung von 3,75 mg/kg<sub>TM</sub> ist insofern signifikant, als dass keine Überschneidung hinsichtlich der  $\pm 10\%$ -Schwankungsbreite stattfindet. In konsequenter Anwendung der hier angewandten Methodik wird deshalb die Zielkonzentration für Mo mit 3,75 mg/kg<sub>TM</sub> angegeben.

### Mangan

Zwischen den gemessenen Mn-Konzentrationen und den zugehörigen  $t_{33}$ -Werten wurde im vorangegangenen Kapitel ein deutlicher Zusammenhang festgestellt. Das in Abbildung 31 dargestellte Ergebnis der Klasseneinteilung und der zugehörigen Klassenmediane zeigt einen deutlichen Sprung von  $t_{33}$  beim Übergang zwischen den Klassen 3 und 4, also zwischen 200 bis < 220 mg/kg<sub>TM</sub> und 220 bis < 280 mg/kg<sub>TM</sub>.

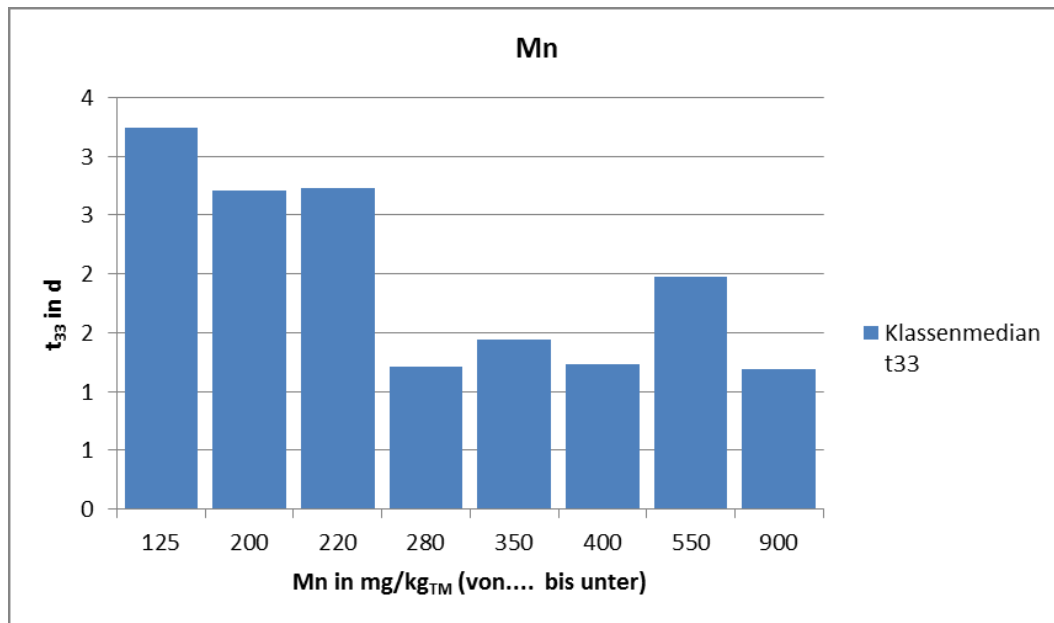
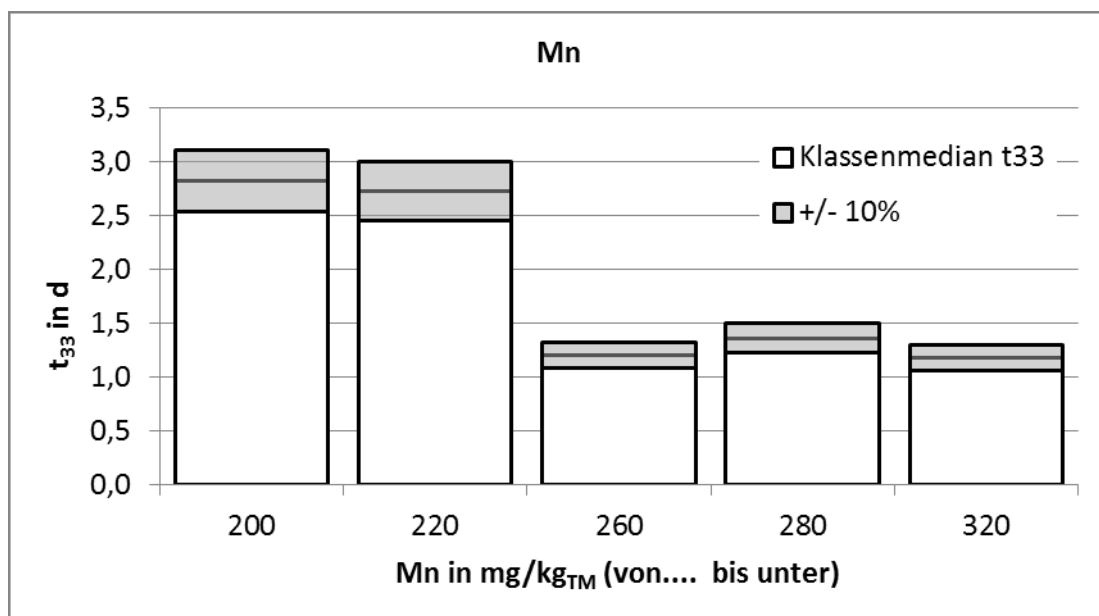


Abbildung 31: Klasseneinteilung und Klassenmediane: Mn

Um die Zielkonzentration weiter einzugrenzen, wurde auch hier eine nochmalige Unterteilung des Bereichs bis < 320 mg/kg<sub>TM</sub> in sechs Klassen vorgenommen, wobei die einzelnen Klassen zwischen 6 und 18 Elemente enthalten. Das in Abbildung 32 gezeigte Ergebnis lässt einen deutlichen sprunghaften Anstieg von  $t_{33}$  bei einer Unterschreitung von 220 mg/kg<sub>TM</sub> erkennen.

Abbildung 32: Klassenmediane  $t_{33}$  für Mn nach Beschränkung des Intervalls und Verkleinerung der Klassenbreite

Die Zielkonzentration für Mn wird analog zu den vorhergehenden Darlegungen mit 260 mg/kg<sub>TM</sub> bestimmt.

## Bor

Dem Spurenelement B wurde im Kapitel 2.3 kein eigener Abschnitt gewidmet, und der Einfluss dieses Elements auf den Prozess der Methangärung ist auch bislang vergleichsweise wenig untersucht worden. Dennoch zeigte sich bei der Korrelationsanalyse ein klarer, wenn auch kein starker Zusammenhang zwischen der B-Konzentration und der biologischen Aktivität der Fermenterproben. Die Darstellung in Abbildung 33 bestätigt diesen Zusammenhang. Es erfolgte eine Einteilung in 7 Klassen mit 7...15 Elementen je Klasse. Mit abnehmender Konzentration von B sinkt tendenziell auch die biologische Aktivität, ausgedrückt als  $t_{33}$ , innerhalb der einzelnen Klassen.

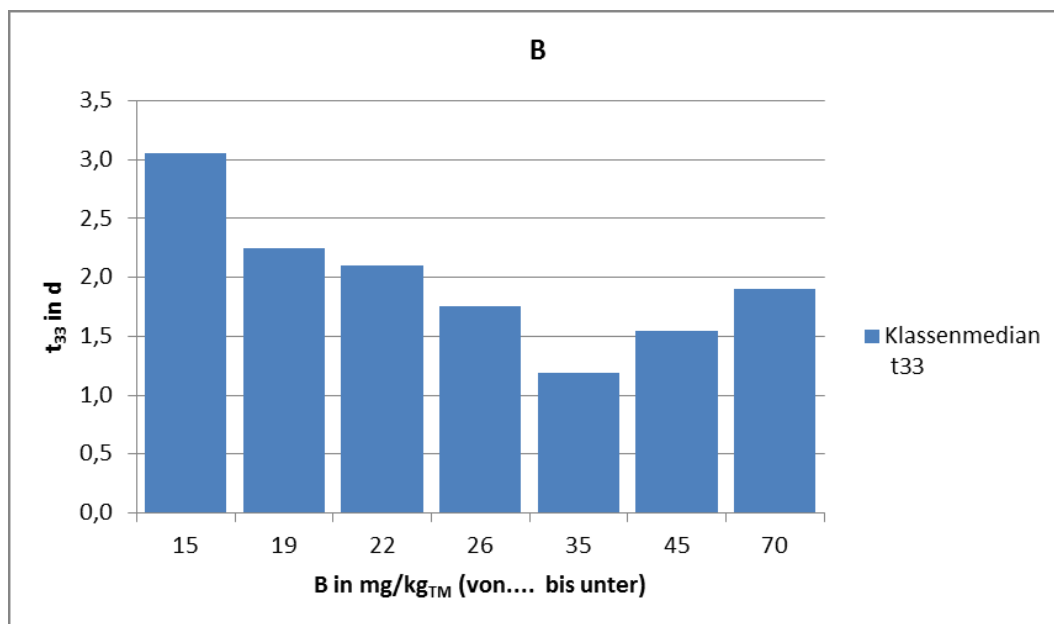
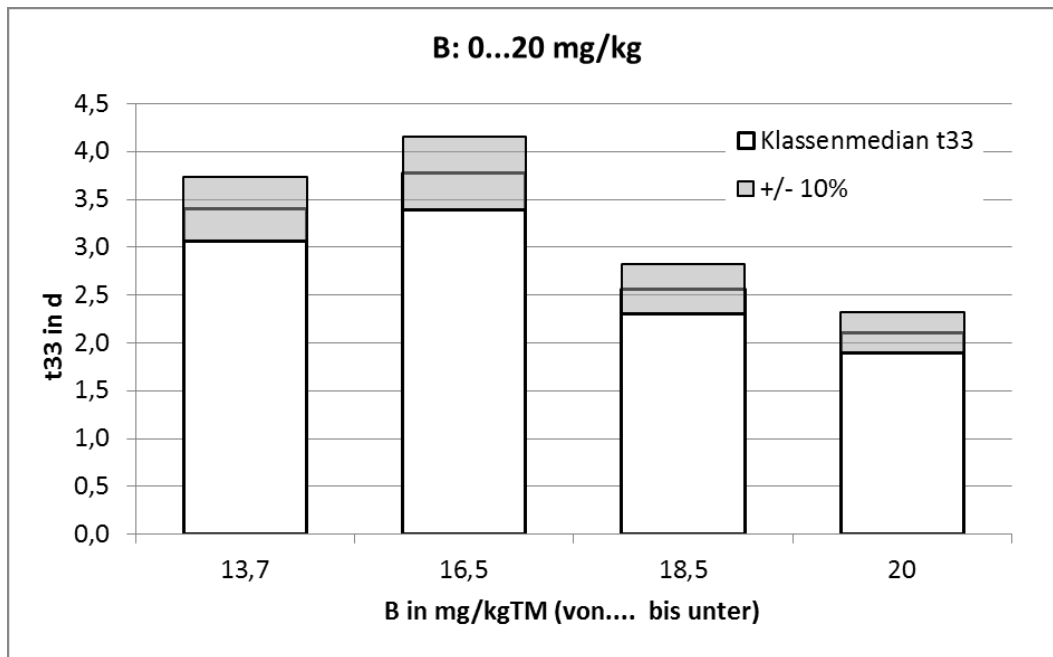


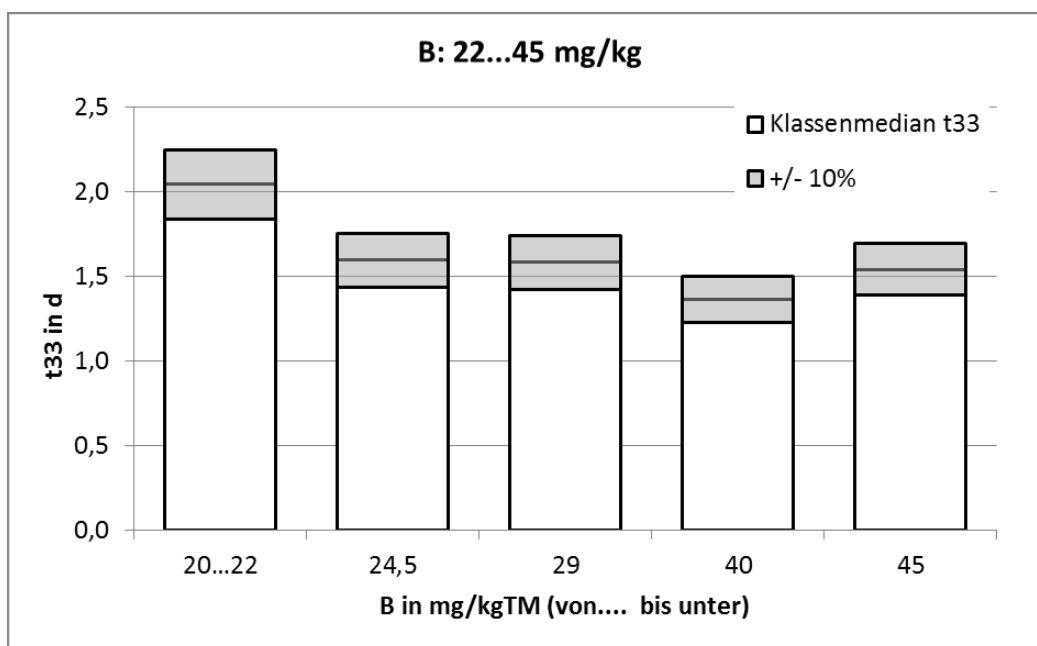
Abbildung 33: Klasseneinteilung und Klassenmediane: B

Ein klarer sprunghafter Übergang bei Unterschreitung einer bestimmten B-Konzentration ist in dieser Darstellung nicht erkennbar. Die Übergänge bei Unterschreitung von 26 bzw. 15 mg/kg<sub>TM</sub> sind jedoch durch stärkere Anstiege von  $t_{33}$  gekennzeichnet. Für beide Übergänge erfolgte jeweils eine weitere Untersuchung mit verkleinerten Klassenbreiten.

Da die Bedarfswerte für B eher in niedrigeren Konzentrationsbereichen zu erwarten sind, wurde zunächst das Intervall von 0...< 20 mg/kg<sub>TM</sub> in vier Klassen mit jeweils 4...7 Elementen unterteilt und die Klassenmediane bezüglich  $t_{33}$  ermittelt. Es zeigt sich ein Sprung bei einer Unterschreitung von 16,5 mg/kg<sub>TM</sub> (siehe Abbildung 34).

Abbildung 34: Klassenmediane  $t_{33}$  für Bor im Intervall 0...< 20 mg/kg<sub>TM</sub>

Der Anstieg ist signifikant in Bezug auf die  $\pm 10\%$ -Schwankungsbreite. Demgegenüber fällt der Anstieg im Intervall von 22 bis 45 mg/kg<sub>TM</sub>, dargestellt in Abbildung 35, schwächer aus.

Abbildung 35: Klassenmediane  $t_{33}$  für Bor im Intervall 22...< 45 mg/kg<sub>TM</sub>

Es ist zwar ein tendenzieller Anstieg von  $t_{33}$  mit abnehmender B-Konzentration erkennbar, jedoch überschneiden sich hier die  $\pm 10\%$ -Bereiche. Für B wird somit eine Zielkonzentration von 18,5 mg/kg<sub>TM</sub> ermittelt.

## Wolfram

Für Wolfram gilt in ähnlicher Weise, was bereits bei Bor ausgeführt wurde. Die Bedeutung für die anaerobe Abbaukette der Methangärung ist unbestritten, aber nur wenig erforscht. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein schwacher statistischer Zusammenhang zwischen der W-Konzentration und  $t_{33}$  nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den anderen untersuchten Spurenelementen liegt für W eine enge Verteilung vor. Die Einteilung erfolgte in 7 Klassen mit jeweils 8...13 Elementen, siehe Abbildung 36, wobei die letzte Klasse alle Elemente mit  $\geq 2,5 \text{ mg/kg}_{\text{TM}}$  umfasst.

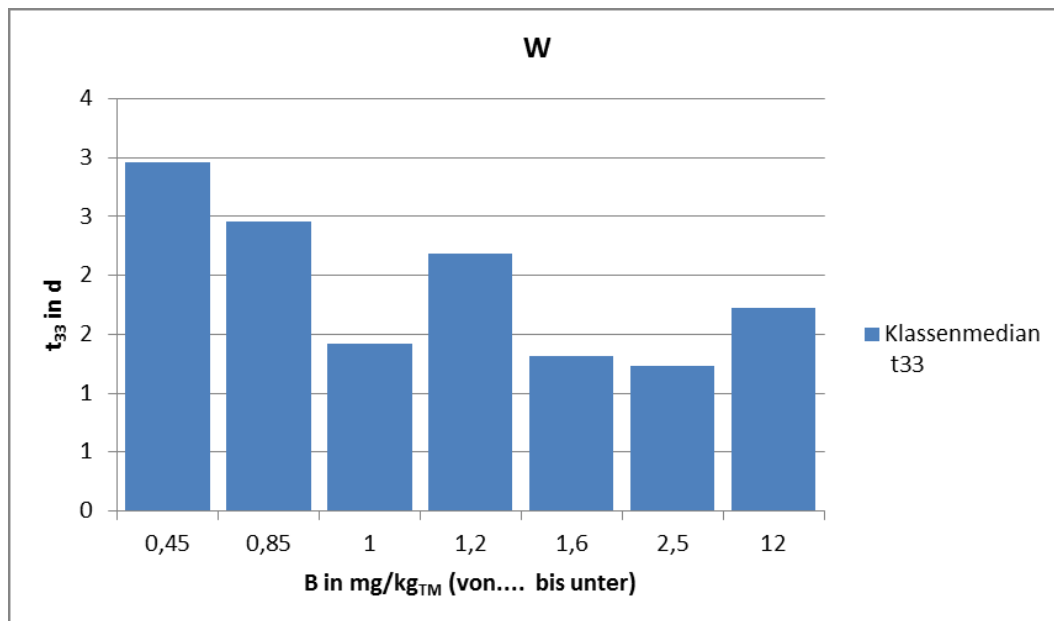


Abbildung 36: Klasseneinteilung und Klassenmediane: W

Der konzentrationsabhängige Anstieg des Klassenmedians findet im Intervall  $0...< 1 \text{ mg/kg}_{\text{TM}}$  statt. Die Klasse von  $1...< 1,2 \text{ mg/kg}_{\text{TM}}$  ist dadurch gekennzeichnet, dass der Klassenmedian oberhalb desjenigen der links bzw. rechts angrenzenden Klasse liegt. Für die detaillierte Untersuchung wurde diese Klasse mit einbezogen und das Intervall von  $0...1,2 \text{ mg/kg}_{\text{TM}}$  in fünf Klassen mit jeweils 7...9 Elementen unterteilt. Das Ergebnis ist in Abbildung 37 dargestellt.



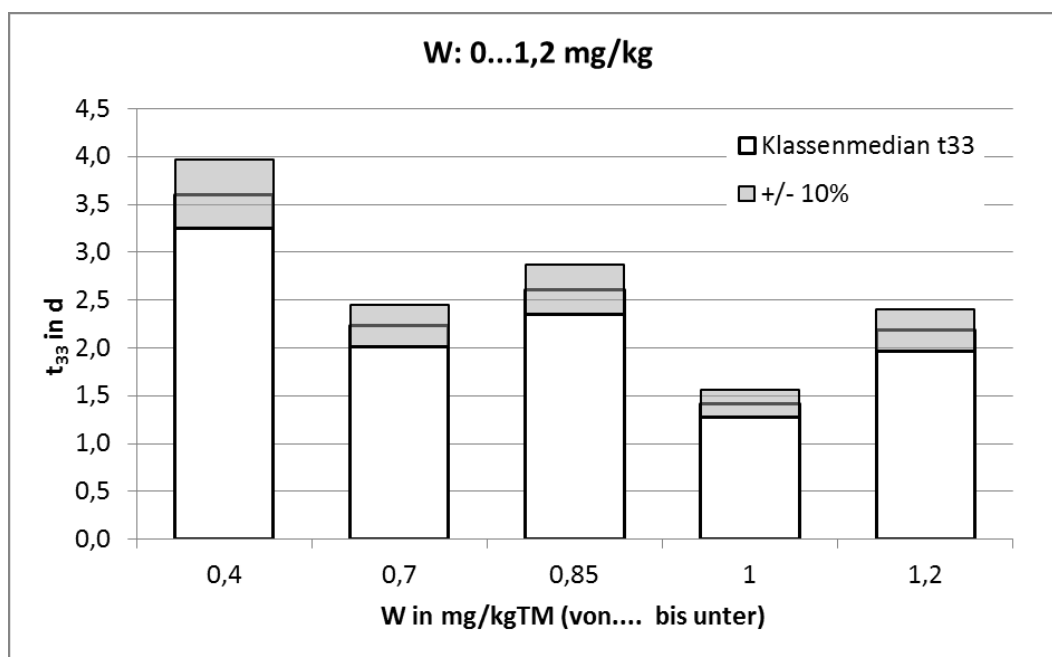


Abbildung 37: Klassenmediane  $t_{33}$  für W im Intervall 0... < 1,2 mg/kg<sub>TM</sub>

Im Intervall 0,85... < 1,2 mg/kg<sub>TM</sub> war keine feinere Unterteilung erfolgt. Da sich die Klassenmediane der Klassen 2, 3 und 5 in Abbildung 37 überschneiden, findet ein signifikanter sprunghafter Anstieg von  $t_{33}$  bei Unterschreitung von 0,4 mg/kg<sub>TM</sub> statt. Die Zielkonzentration für Wolfram beträgt entsprechend der oben getroffenen Vereinbarungen 0,7 mg/kg<sub>TM</sub>.

#### 4.3.3. Zielkonzentrationen für Selen und Cobalt

Für die beiden Spurenelemente Se und Co wurde in Kapitel 4.3.1 nur ein sehr schwacher und dazu noch positiver Zusammenhang zu  $t_{33}$  ermittelt. Der bei den anderen Spurenelementen verwendete Ansatz zur Ableitung von Zielkonzentrationen ist demzufolge für diese beiden Komponenten nicht anwendbar. Die schwache Korrelation kann unter anderem mit der Unsicherheit der analytischen Bestimmung bei sehr kleinen Konzentrationen zusammenhängen. Die mittlere gemessene Konzentration von Co lag bei 3,68 mg/kg<sub>TM</sub>, von Se bei 1,22 mg/kg<sub>TM</sub>, dies waren (mit Ausnahme von W) die niedrigsten im Untersuchungsfeld. Auch die sehr niedrige Toxizitätsschwelle von Se kann eine Ursache für die positive Korrelation sein. Selen wurde lange Zeit als Umweltgift angesehen, die gleichzeitig essentielle Bedeutung für viele Mikroorganismen hat auch zu der Bezeichnung „essentielles Gift“ geführt. [53], [54]

In Kapitel 4.1.1 wurde bereits gezeigt, wie bei der Verwendung von reiner Stärke als Substrat einzelne Phasen der Methangärung einer getrennten Untersuchung zugänglich gemacht werden können. Da sowohl Co als auch Se hauptsächlich für Reaktionsschritte der Methanogenese benötigt werden, bildet dies einen möglichen Ansatz, Zielkonzentrationen auch für Co und Se zu bestimmen. Im Rahmen der Arbeit wurden 21 auswertbare Versuche mit Maisstärke als Substrat

durchgeführt. Diese Anzahl ist gering im Vergleich zu den Versuchen mit dem synthetischen Standardsubstrat, für grundlegende statistische Untersuchungen jedoch noch ausreichend.

Für die Beurteilung der Abbauleistung in der Acetogenese/Methanogenese kann der Anstieg  $s_2$  der Gassummenkurve entsprechend Kapitel 4.1.1 herangezogen werden. Für die Bestimmung von  $s_2$  wurde zunächst aus den grafischen Darstellungen für jede untersuchte Probe das Zeitintervall ermittelt, das die zweite lineare Phase der normierten Gassummenkurven repräsentiert. In Abbildung 38 sind typische Verläufe anhand mehrerer Beispiele gezeigt. Das Zeitintervall für die zweite lineare Phase liegt typischerweise im Bereich 1,0...3,0 d, bei einigen Proben mit sehr schnellem Substratumsatz in Bereich 0,8...1,5 d.

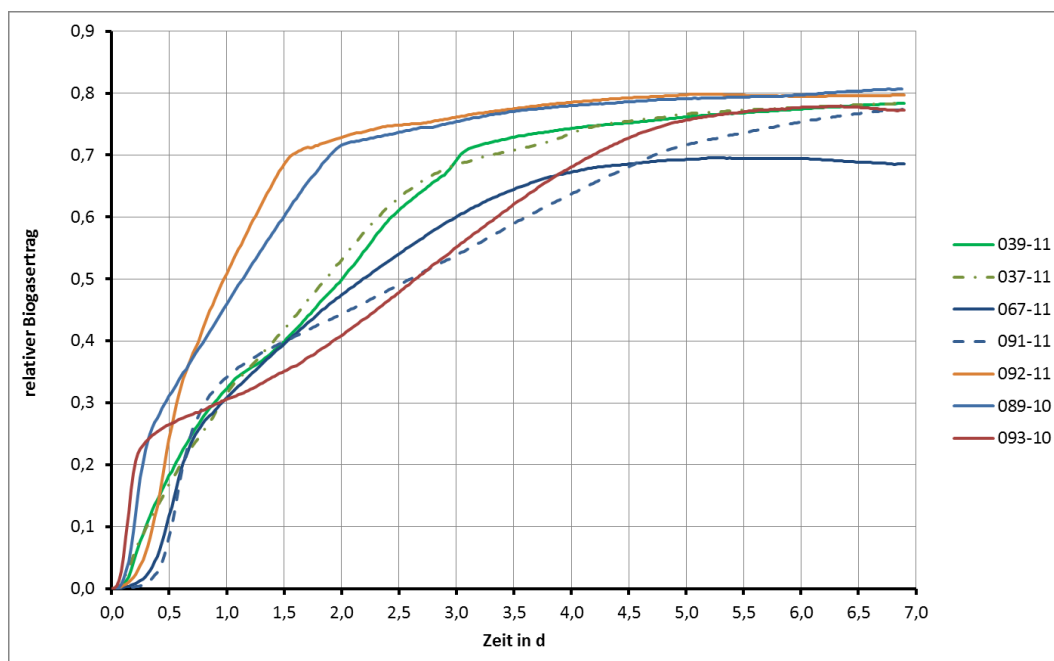


Abbildung 38: Beispiele für normierte Gassummenkurven bei Verwendung von Maisstärke als Substrat

Anschließend wurde eine lineare Regression der Gassummenkurven im jeweiligen Zeitintervall durchgeführt. Dazu wurde die unter MS EXCEL<sup>®</sup> verfügbare Funktion *RGP* verwendet, die neben der Steigung  $s$  der Regressionsgeraden auch den Schnittpunkt mit der y-Achse sowie das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  angibt. Die aus den normierten Kurven bestimmten Anstiege haben die Dimension  $d^{-1}$  und liegen im Bereich von 0,04 bis 0,3  $d^{-1}$ , was eine ausreichende Differenzierung der Proben ermöglicht. Das Bestimmtheitsmaß für die Regression ist bei allen untersuchten Proben mit  $R^2 \geq 0,991$  ausreichend hoch.

Die nach der Größe von  $s_2$  geordnete Darstellung in Abbildung 39 lässt eine Gruppierung der 21 untersuchten Fermenterproben erkennen. Die Gruppe 1 umfasst die ersten sieben Proben ( $i = 1 \dots 7$ ) mit niedrigen Werten für  $s_2$ . Es folgt ein sprunghafter Anstieg in der Gruppe 2, welche die verbleibenden 15 Fermenterproben ( $i = 8 \dots 21$ ) umfasst.

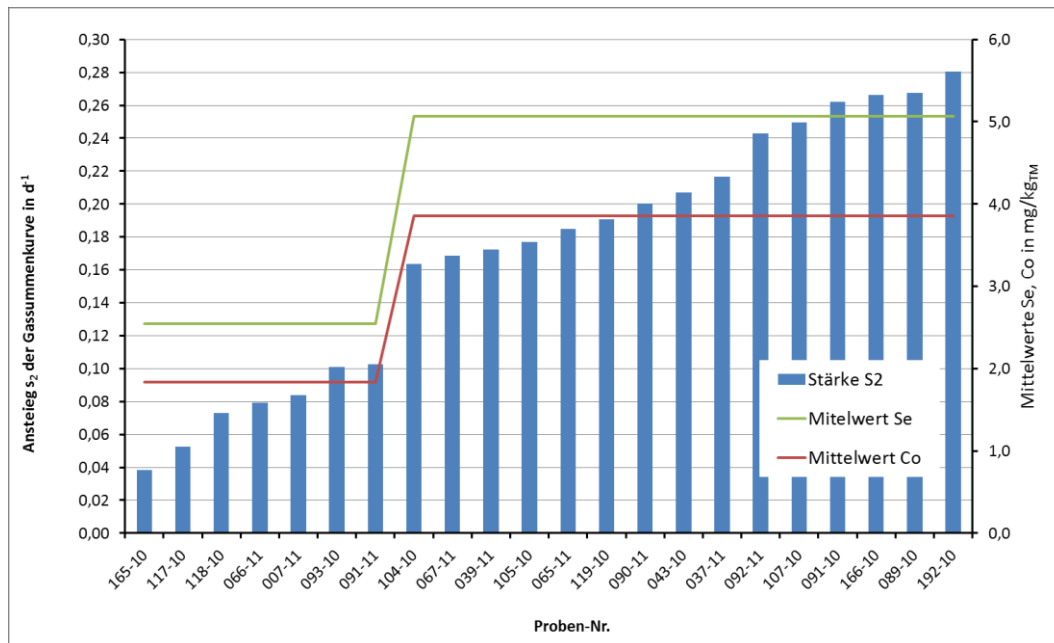


Abbildung 39: Ermittelte Anstiege  $s_2$  der normierten Gassummenkurven aus Maisstärke und Konzentrationen von Se und Co als Gruppenmittelwerte

Ebenfalls in Abbildung 39 dargestellt sind die Mittelwerte der Co- und Se-Konzentrationen in den beiden Gruppen. Die jeweils deutlich höheren Konzentrationen in der Gruppe 2 legen nahe, dass ein Zusammenhang zwischen der biologischen Aktivität der Acetogenese/Methanogenese und der Konzentration von Co und Se besteht.

Um zu prüfen, ob beide Gruppen zu einer Grundgesamtheit gehören oder ob tatsächlich ein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich  $s_2$  besteht, wurde ein t-Test auf Mittelwerthomogenität durchgeführt. Die Anzahl von  $n = 7$  Elementen in der Gruppe 1 stellt dabei die Untergrenze dar, für die ein t-Test noch durchführbar ist. [72] Geprüft wurde die Nullhypothese  $H_0$  „beide Gruppen gehören zur gleichen Grundgesamtheit“ (unterscheiden sich also nicht signifikant hinsichtlich des Mittelwertes für  $s_2$ ) gegen die Alternativhypothese „Beide Gruppen gehören zu verschiedenen Grundgesamtheiten“. Neben der Untersuchung der Anstiege wurde auch geprüft, ob sich die Gruppen hinsichtlich der Konzentrationen von Se und Co signifikant unterscheiden. Die Formulierung der Hypothesen ist analog zur Vorgehensweise bei der Prüfung bezüglich  $s_2$ . Die Tests wurden wieder mit Hilfe der Statistik-Software Mynstat durchgeführt, die Ergebnisse sind in Tabelle 18 zusammengefasst.

Tabelle 18: Zusammenfassung der t-Tests auf Mittelwerthomogenität

Prüfgröße	Einheit	p-Wert	Interpretation
Anstieg $S_2$	$d^{-1}$	0,00	$H_0$ kann abgelehnt werden
Co-Konzentration	mg/kg <sub>TM</sub>	0,032	$H_0$ kann auf 5%-Signifikanzniveau abgelehnt werden
Se-Konzentration	mg/kg <sub>TM</sub>	0,018	$H_0$ kann auf 5%-Signifikanzniveau abgelehnt werden

Der p-Wert als Irrtumswahrscheinlichkeit für eine fälschliche Ablehnung von  $H_0$  ist in allen Fällen  $< 0,05$ . Das bedeutet, die Nullhypothese kann auf 5%-Signifikanzniveau abgelehnt werden. Die beiden oben definierten Gruppen 1 und 2 unterscheiden sich signifikant sowohl hinsichtlich des Mittelwertes für  $s_2$  als auch hinsichtlich des Mittelwertes der Co- und Se-Konzentrationen. Auf Basis dieser Ergebnisse können somit Zielkonzentrationen auch für Co und Se angegeben werden.

Allein aufgrund des zahlenmäßig geringen Datenmaterials kann bei der Auswertung von  $s_2$  keine weitere Differenzierung als die Einteilung in die Gruppen 1 bzw. 2 vorgenommen werden. Die Definition der Zielkonzentrationen erfolgt daher, wie bei den anderen Spurenelementen, anhand der Mediane der Konzentrationen beider Spurenelemente in der Gruppe mit der höheren Abbauleistung, also der Gruppe 2. Für Co werden damit 2,1 mg/kg<sub>TM</sub> und für Se 1,0 mg/kg<sub>TM</sub> als Zielkonzentrationen definiert.

## 5. Schlussfolgerungen und weiterer Forschungsbedarf

Im vorangegangenen Kapitel wurde dargelegt, wie die Zielkonzentrationen für die einzelnen untersuchten Spurenelemente anhand der experimentell ermittelten Daten bestimmt wurden. Ein Vergleich der so ermittelten Zielkonzentrationen mit Werten, die von anderen Arbeitsgruppen bestimmt und publiziert wurden, wird in Tabelle 19 gezogen. Obwohl die Methodik zur Ermittlung der Bedarfswerte bei den einzelnen Arbeitsgruppen sehr verschieden war, ergeben sich für die meisten Spurenelemente gute bis sehr gute Übereinstimmungen.

Tabelle 19: Zusammenfassung der ermittelten Zielkonzentrationen und Vergleich mit anderen Quellen

Quelle / Autor		Fe	Zn	Co	Cu	Mn	Mo	Ni	B	Se	W
		mg/kg <sub>TM</sub>									
Preißler et. al. [52]	min	750	30	0,4	10	100	0,05	4,0	k.A.	0,05	0,1
	opt.	<b>2.400</b>	<b>200</b>	<b>1,8</b>	<b>40</b>	<b>300</b>	<b>4,0</b>	<b>16</b>	<b>k.A.</b>	<b>0,5</b>	<b>0,6</b>
	max	5.000	400	10	80	1.500	16	30	k.A.	4,0	30
Kabasci et. al. [83]		<b>2.000</b>	<b>137</b>	<b>0,8</b>	<b>24</b>	<b>200</b>	<b>2,5</b>	<b>4,0</b>	<b>k.A.</b>	<b>0,3</b>	<b>k.A.</b>
Lindorfer [41]	von	<b>1.200</b>	<b>100</b>	<b>1,0</b>	<b>18</b>	<b>100</b>	<b>2,6</b>	<b>4,0</b>	<b>17,5</b>	<b>0,4</b>	<b>0,8</b>
	bis	<b>3.000</b>	<b>250</b>	<b>4,0</b>	<b>50</b>	<b>300</b>	<b>8,0</b>	<b>10</b>	<b>30</b>	<b>2,0</b>	<b>3,0</b>
Eigene, (Basis t <sub>33</sub> )		<b>1.800</b>	<b>130</b>	<b>2,1*</b>	<b>24</b>	<b>260</b>	<b>3,8</b>	<b>4,0</b>	<b>18,5</b>	<b>1,0*</b>	<b>0,7</b>

\*: Zielkonzentration wurde auf Basis von s<sub>2</sub> ermittelt

Leicht abweichende Bewertungen sind unter anderem bezüglich Ni zu verzeichnen. Die in dieser Arbeit gefundene Zielkonzentration von 4,0 mg/kg<sub>TM</sub> wurde von den anderen Arbeitsgruppen als Untergrenze ermittelt, die jedoch nicht die optimale Versorgung repräsentiert. Dazu ist festzustellen, dass die in dieser Arbeit angewandte Methodik darauf basiert, dass bei Unterschreitung einer Mindestkonzentration ein signifikanter Einbruch der Abbauleistung der Fermenterbiologie erfolgt. Somit werden methodisch bedingt eher Minimalwerte als Optimalwerte ermittelt. Diese Tendenz ist auch bei Fe, Zn, und Cu zu beobachten. Bei den Komponenten Ni, Se und W erschweren die sehr geringen gemessenen Konzentrationen den analytischen Nachweis. Der Einfluss von Bor wurde nur von einer weiteren Arbeitsgruppe untersucht.

Die Ermittlung der Zielkonzentrationen für Co und Se erfolgte anhand einer wesentlich kleineren Datenmenge und anhand eines anderen Bewertungsparameters für die biologische Abbauleistung (siehe Kapitel 4.3.3). Daher ist die Übereinstimmung mit den Arbeiten anderer Arbeitsgruppen weniger gut. Die Zielkonzentrationen liegen etwas höher als die Vergleichswerte der anderen Arbeitsgruppen, weil nur zwei Cluster von Fermenterproben definiert wurden und die Zielkonzentration sich am Zentralwert der Gruppe mit der höheren Abbauaktivität orientiert. Die Unterschiede zu den Vergleichswerten entsprechend Tabelle 19 sind jedoch nicht so groß, dass die Plausibilität der Ergebnisse anzuzweifeln wäre.

Bezüglich des weiteren Forschungsbedarfs stellt die Problematik der Bioverfügbarkeit einen Schwerpunkt dar. [81], [84] Alle in Tabelle 19 zitierten Arbeitsgruppen differenzieren ausdrücklich nicht hinsichtlich des bioverfügbaren und des gebundenen Anteils der Spurenelemente. Bei LINDORFER [41] wird noch zwischen den Gehalten im klaren Überstand (nach Zentrifugation und Filtration der Fermenterprobe) und in der Gesamtprobe unterschieden. Dabei wird unterstellt, dass die Gehalte im klaren Überstand im Wesentlichen die bioverfügbare Fraktion repräsentieren. Arbeiten von FEHER legen allerdings nahe, dass die Verteilung Festphase/Flüssigphase in keiner Korrelation zur Bioverfügbarkeit steht. [82] Ein Verfahren zur Bewertung der Verfügbarkeit der Spurenelemente mit Hilfe einer sequentiellen Extraktion wird derzeit erarbeitet. [10] Die bisherigen Arbeiten lassen jedoch erkennen, dass eine strikte Trennung in bioverfügbare/nicht bioverfügbare Fraktionen nur eingeschränkt möglich ist. Bei Versuchen mit gezielter Spurenelementverarmung wurde beobachtet, dass die Mikroorganismen bei einem auftretenden Mangel auch Spurenelemente aus Bindungsformen aufnehmen können, die bislang eindeutig der nicht bioverfügbaren Fraktion zugeordnet wurden. [82] Selbst die Aufnahme von Ni und Co aus sulfidischen Bindungsformen scheint möglich zu sein. [85] Ob dies auf die Tätigkeit der Mikroorganismen zurückzuführen ist oder auf chemische Gleichgewichtszustände, ist bislang nicht geklärt. Eng mit der Bioverfügbarkeit verknüpft ist die Frage, in welcher Bindungsform Spurenelemente in den Fermenter eingebracht werden sollen, um einen maximalen Effekt zu erzielen. Mehrere experimentelle Untersuchungen, z.B. in [86], legen nahe, dass eine Bindung in metallorganischen Komplexen (Chelatkomplexe) eine hohe Bioverfügbarkeit gewährleisten. In den meisten kommerziell verfügbaren Präparaten liegen darum die Spurenelemente als Chelatkomplexe vor. Ob diese Bindungsform tatsächlich in allen Fällen eine maximale Bioverfügbarkeit sichert, ist bislang noch nicht vollständig geklärt.

Bei der Bewertung der erzielten Erkenntnisse im Vergleich mit dem internationalen Stand des Wissens ist weiterhin zu berücksichtigen, dass ein Betrieb von Biogasfermentern mit einem überwiegenden Anteil von NaWaRo oder gar eine NaWaRo-Monovergärung aufgrund der speziellen Fördersituation nahezu ausschließlich in Deutschland stattfindet. Die aus einem solchen Anlagenbetrieb resultierenden hohen Raumbelastungen, verbunden mit hohen TS-Gehalten im Fermenter, stellen besondere, im Allgemeinen höhere Anforderungen an die Spurenelementversorgung. [41] Der funktionale Zusammenhang zwischen den Betriebsparametern des Fermenters wie Raumbelastung, hydraulische Verweilzeit und TS-Gehalt und dem tatsächlichen Spurenelementbedarf ist noch aufzuklären.

Wie bereits im Kapitel 2 angesprochen, existieren auch für die Spurenelementkonzentrationen Obergrenzen, ab denen mit einer Hemmwirkung gerechnet werden muss. Während für die als toxisch bekannten Schwermetalle diese

Obergrenzen recht gut belegt sind, z.B. in [87] [5], gibt es hierzu bezüglich der essentiellen Spurenelemente teilweise sehr unterschiedliche Aussagen. So wird von einigen Autoren die hemmende Wirkung von Cu als in Praxisanlagen praktisch nicht relevant angesehen, [61] während andere hier klare Obergrenzen definieren, die in Praxisanlagen durchaus erreicht oder sogar überschritten wurden, ohne dass Prozessstörungen beobachtet wurden. [88] Die in dieser Arbeit vorgestellte Methode zur Messung der biologischen Aktivität kann in abgewandelter Form auch dazu verwendet werden, Obergrenzen für einzelne Spurenelemente oder Schwermetalle zu bestimmen. Dabei wird davon ausgegangen, dass sich die Kinetik des Substratumsatzes durch die Anwesenheit eines Hemmstoffs verändert. Vergleichsversuche mit stufenweiser Zugabe des potenziellen Hemmstoffs erlauben somit eine Bestimmung von Obergrenzen. Erste Arbeiten hierzu sind bereits durchgeführt und publiziert worden. [89] Der Schwachpunkt dieser Methodik ist, dass es sich um batch-Ansätze handelt und somit lediglich akute Hemmwirkungen nachgewiesen werden. Für die Untersuchung von Akkumulationseffekten sind weitaus aufwändigere kontinuierliche Versuchsansätze erforderlich. Hier besteht aus derzeitiger Sicht, insbesondere vor dem Hintergrund der zunehmenden Bedeutung der Abfallvergärung, noch großer Forschungsbedarf.

## 6. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Zielkonzentrationen für essentielle Spurenelemente in NaWaRo-Biogasfermentern ermittelt. Dafür wurde zunächst eine Methode zur Quantifizierbarkeit der Substratumsatzleistung der Fermenterbiologie entwickelt und diese anschließend auf über 70 Fermenterproben angewandt. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Messung der Gasbildungskinetik aus einem standardisierten Substrat unter genormten Randbedingungen eine Bewertung der Fermenterprobe hinsichtlich der biologischen Aktivität ermöglicht. Das verwendete synthetische Standardsubstrat hat sich als leicht abbaubar und nahezu vollständig umsetzbar erwiesen. Die aktivsten Fermenterproben konnten innerhalb von 7 d das Substrat zu ca. 80 % (bezogen auf das stöchiometrische Maximum) umsetzen. Der Nachweis der Eignung des methodischen Prinzips konnte somit erbracht werden.

Der entwickelte Bewertungsparameter  $t_{33}$  ist praktisch anwendbar und ermöglicht die differenzierte Bewertung der Abbauaktivität verschiedener Fermenterproben. Die Verwendung von Maisstärke als Standardsubstrat erlaubt zusätzlich eine getrennte Untersuchung einzelner Phasen der Methangärung. Hierfür wurde ein weiterer Bewertungsparameter, der Anstieg  $s_2$  der Gassummenkurve in der zweiten linearen Phase, eingeführt. Unter Verwendung dieser beiden Bewertungsparameter konnten statistische Zusammenhänge zwischen der Spurenelementversorgung und der Abbauleistung der Fermenterbiologie gefunden

werden. Auf Basis dieser Zusammenhänge wurden die Zielkonzentrationen von zehn Spurenelementen, definiert als im Fermenter einzustellende Untergrenzen, ermittelt. Dabei wurde der sprunghafte Rückgang der Substrat-Umsatzleistung der Fermenterbiologie bei Unterschreitung einer bestimmten Konzentration des jeweiligen Spurenelements als Entscheidungskriterium herangezogen. Bei einigen Komponenten wie Cu, Zn, Mn oder W war dieser Sprung sehr deutlich, bei anderen Elementen wie z.B. Ni nur schwach ausgeprägt. Ein Vergleich der ermittelten Zielkonzentrationen mit Daten von anderen Arbeitsgruppen zeigt für alle untersuchten Komponenten weitgehende Übereinstimmungen.

Für die Elemente Co und Se konnten auf Basis der Versuche mit dem synthetischen Standardsubstrat keine Zielkonzentrationen ermittelt werden. Die Auswertung der (zahlenmäßig deutlich geringeren) Versuche mit reiner Stärke konnte jedoch einen Zusammenhang zwischen der Konzentration dieser beiden Komponenten und der Aktivität der Acetogenese/Methanogenese aufzeigen. Auch für Co und Se wurden so Zielkonzentrationen bestimmt, welche gut mit den bislang publizierten Werten übereinstimmen.

Das Testverfahren kann in modifizierter Form auch als Hemmstofftest Anwendung finden. Entsprechende Versuche und erste Ergebnisse wurden bereits publiziert.

Die Zukunft der Vergärungstechnologie in Deutschland, aber auch international, wird durch eine wachsende Bedeutung der Abfallvergärung gekennzeichnet sein. Dies betrifft sowohl den biogenen Anteil des Restabfalls als auch industrielle organische Reststoffe und Abprodukte. Speziell die Letztgenannten fallen zum Teil lokal in großen Mengen an und machen somit eine Monovergärung wirtschaftlich attraktiv. Eine Prozessstabilisierung durch Zugabe von Spurenelementpräparaten wird dabei in vielen Fällen zwingend erforderlich sein. [90] Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse liefern eine gute Ausgangsbasis für einen optimierten Einsatz dieser Präparate. Zukünftige Forschungsarbeiten zur Bioverfügbarkeit und zum Spurenelementbedarf bei der Monovergärung spezieller Substrate können einen wesentlichen Beitrag leisten, um die vorhandenen organischen Abfälle hocheffizient und mit geringen Umweltbelastungen in Biogasanlagen energetisch zu nutzen.



## 7. Literatur

1. DIN 1301 T1 : Einheiten. Beuth Verlag, Berlin (2002).
2. Lemmer A., Vintiloiu A. and Preißler D., Untersuchungen zum Einsatz von Mineralstoffen in Biogasanlagen. In: *Gülzower Fachgespräche Band 35*, Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe (FNR) e.V., Gülzow (2011).
3. Hölker U., Was leisten Zusatzstoffe und Hilfsmittel zur Optimierung der Biogasproduktion? In: *Gülzower Fachgespräche Band 32*, Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe (FNR) e.V., pp. 108-119 (2009).
4. Fritz T., ACTILINC-die hochverfügbaren Metall-Chelate für Biogasanlagen. In: 6. *Biogas- Innovationskongress*, ProFair Consult+Project GnbH, Osnabrück, pp. 63-68 (2013).
5. Chen Y., Cheng J.J. and Creamer K.S., Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource Technology*, **99**, 4044-4064 (2008).
6. Zhang L., Lee Y.W. and Jahng D., Anaerobic co-digestion of food waste and piggery wastewater: Focusing on the role of trace elements. *Bioresource Technology*, **102**, 5048-5059 (2011).
7. Qiang H., Lang D.L. and Li Y.Y., High-solid mesophilic methane fermentation of food waste with an emphasis on Iron, Cobalt, and Nickel requirements. *Bioresource Technology*, **103**, 21-27.
8. Uemura S., Mineral requirements for mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of organic solid waste. *International Journal of Environmental Research*, **4**, 33-40 (2010).
9. Banks C.J., Zhang Y., Jiang Y. and Heaven S., Trace element requirements for stable food waste digestion at elevated ammonia concentrations. *Bioresource Technology*, **104**, 127-135 (2012).
10. Feher A.L., A. ; Fritz, T. ; Nelles, M., Bedarfsgerechter Einsatz von Spurenelement-Biogasadditiven unter Berücksichtigung der Bioverfügbarkeit. In: 6. *Biogas- Innovationskongress*, ProFair Consult+Project GmbH, Osnabrück, pp. 55-62 (2013).
11. Worm P., Feroso F.G., Lens P.N.L. and Plugge C.M., Decreased activity of a propionate degrading community in a UASB reactor fed with synthetic medium without molybdenum, tungsten and selenium. *Enzyme and Microbial Technology*, **45**, 139-145 (2009).
12. Takashima M., Shimada K. and Speece R.E., Minimum requirements for trace metals (iron, nickel, cobalt, and zinc) in thermophilic and mesophilic methane fermentation from glucose. *Water Environment Research*, **83**, 339-346 (2011).
13. VDI, *VDI Richtlinie 4630: Vergärung organischer Stoffe Substratcharakterisierung, Probenahme, Stoffdatenerhebung, Gärversuche*. Beuth Verlag, Berlin (2006).
14. Finck A., *Pflanzenernährung und Düngung*. Geb. Borntraeger Verlagsbuchhandlung, Stuttgart (2007).
15. Mac Dowell L., *Minerals in animal and human nutrition*. Elsevier, Amsterdam (2003).

16. Kirchgeßner M., *Tierernährung: Leitfaden für Studium, Beratung und Praxis*. DLG-Verlag, Frankfurt am Main (2008).
17. Symons G.E. and Buswell A.M., The methane fermentation of carbohydrates. *Journal of the American Chemical Society*, **55**, 2028-2036 (1933).
18. Bryant M.P., Wolin E.A., Wolin M.J. and Wolfe R.S., Methanobacillus omelianskii, a symbiotic association of two species of bacteria. *Archiv für Mikrobiologie*, **59**, 20-31 (1967).
19. Braun R., *Biogas, Methangärung organischer Abfallstoffe*. Springer, Wien (1982).
20. Bauer C., Lebuhn, M., Gronauer, A., *Mikrobiologische Prozesse in Landwirtschaftlichen Biogasanlagen Schriftenreihe der bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft Heft 11* (2009).
21. Batstone D.J., Keller J., Angelidaki I., Kalyuzhnyi S.V., Pavlostathis S.G., Rozzi A., Sanders W.T., Siegrist H. and Vavilin V.A., The IWA Anaerobic Digestion Model No 1 (ADM1). *Water Science and Technology*, **45**, 65-73 (2002).
22. Hecht C., Untersuchungen zum anaeroben Abbau proteinreicher Reststoffe, Dissertationsschrift. Technische Universität Dresden, Dresden (2010).
23. BRENDA-The comprehensive Enzyme Information System ([www.brenda.org](http://www.brenda.org)).
24. Bischofsberger, *Anaerobtechnik*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg (2005).
25. Hanaki K., Matsuo T. and Nagase M., Mechanism of inhibition caused by long-chain fatty acids in anaerobic digestion process. *Biotechnology and Bioengineering*, **23**, 1591-1610 (1981).
26. Gehrig S., *Güllefreie Vergärung von Mischsubstraten aus Energiepflanzen am Beispiel der Pilotbiogasanlage Obernjesa*. Sierke Verlag, Göttingen (2007).
27. Zehnder A.J.B., *Oekologie der Methanbakterien - Abhandlung zur Erlangung des Titels eines Doktors der naturwissenschaften*. Juris Druck + Verlag, Zürich (1976).
28. Schattauer A., Abdoun E., Weiland P., Plöchl M. and Heiermann M., Abundance of trace elements in demonstration biogas plants. *Biosystems Engineering*, **108**, 57-65 (2010).
29. Heuwinkel H., Andrade, D., Wagner, D., Bredendiek, K., Bischof, M., Optimierung der anaeroben Fermentierung durch mineralische Zusatzstoffe. In: *Biogas Science 2009*, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft-LfL, Erding, pp. 85-95 (2009).
30. Oleszkiewicz J.A. and Sharma V.K., Stimulation and inhibition of anaerobic processes by heavy metals A review. *Biological Wastes*, **31**, 45-67 (1990).
31. FNR, Einsatz von Hilfsmitteln zur Steigerung der Effizienz und Stabilität des Biogasprozesses. In: *Gülszower Fachgespräche*, e.V. F.N.R. (ed.), Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V., Gülzow (2011).
32. Feng X.M., Karlsson A., Svensson B.H. and Bertilsson S., Impact of trace element addition on biogas production from food industrial waste – linking process to microbial communities. *FEMS Microbiology Ecology*, **74**, 226-240 (2010).

33. Romera E.R., Otazua B.G. and Rossi F.R., Optimization of anaerobic processes by speciation and bioavailability of trace metals. *Toxicological and Environmental Chemistry*, **89**, 281-293 (2007).
34. Noyola A. and Tinajero A., Effect of biological additives and micronutrients on the anaerobic digestion of physicochemical sludge. In: *Water Science and Technology*, pp. 275-281 (2005).
35. Xu H., Aiyuk S., Zhang Y., Chen G., Pieters J. and Verstraete W., Stimulation of methanogenesis in a laboratory scale UASB reactor treating domestic sewage by Fe(0) application. *Environmental Technology*, **25**, 613-619 (2004).
36. Gencic S., Duin E.C. and Grahame D.A., Tight coupling of partial reactions in the Acetyl-CoA Decarbonylase/ Synthase (ACDS) multienzyme complex from *Methanosarcina thermophila*: Acetyl C-C bond fragmentation at the A cluster promoted by protein conformational changes. *Journal of Biological Chemistry*, **285**, 15450-15463.
37. Zhang L. and Jahng D., Long-term anaerobic digestion of food waste stabilized by trace elements. *Waste Management*, **32**, 1509-1515 (2012).
38. Zhang W., Wu S., Lang Q. and Dong R., Trace elements on influence of anaerobic fermentation in biogas projects. *Nongye Gongcheng Xuebao/Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, **29**, 1-11 (2013).
39. Zhang Y., Zhang Z., Suzuki K. and Maekawa T., Uptake and mass balance of trace metals for methane producing bacteria. *Biomass and Bioenergy*, **25**, 427-433 (2003).
40. Climenhaga M.A. and Banks C.J., Anaerobic digestion of catering wastes: Effect of micronutrients and retention time. In: *Water Science and Technology*, pp. 687-692 (2008).
41. Lindorfer H., Analyse und Bewertung der Spurenelementversorgung von Mikroorganismen. In: 3. VDI Wissensforum "Prozessmesstechnik an Biogasanlagen", Jan Liebetrau, Daniela Thrän, Diana Pfeiffer (Hrsg.), Leipzig (2013).
42. Demirel B. and Scherer P., Trace element requirements of agricultural biogas digesters during biological conversion of renewable biomass to methane. *Biomass and Bioenergy*, **35**, 992-998.
43. Fermoso F.G., Bartacek J., Jansen S. and Lens P.N.L., Metal supplementation to UASB bioreactors: from cell-metal interactions to full-scale application. *Science of The Total Environment*, **407**, 3652-3667 (2009).
44. Zandvoort M.H., van Hullebusch E.D., Fermoso F.G. and Lens P.N.L., Trace metals in anaerobic granular sludge reactors: Bioavailability and dosing strategies. *Engineering in Life Sciences*, **6**, 293-301 (2006).
45. Baresi L. and Wolfe R.S., Levels of coenzyme F420, coenzyme M, hydrogenase, and methylcoenzyme M methylreductase in acetate grown *Methanosarcina*. *Applied and Environmental Microbiology*, **41**, 388-391 (1981).
46. Diekert G., Konheiser U., Piechulla K. and Thauer R.K., Nickel requirement and factor F430 content of methanogenic bacteria. *Journal of Bacteriology*, **148**, 459-464 (1981).

47. Krongthamchat K., Riffat R. and Dararat S., Effect of trace metals on halophilic and mixed cultures in anaerobic treatment. *International Journal of Environmental Science and Technology*, **3**, 103-112 (2006).
48. Burgess J.E., Quarmby J. and Stephenson T., Role of micronutrients in activated sludge-based biotreatment of industrial effluents. *Biotechnology Advances*, **17**, 49-70 (1999).
49. Schönheit P., Moll J. and Thauer R.K., Nickel, cobalt, and molybdenum requirement for growth of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Archives of Microbiology*, **123**, 105-107 (1979).
50. Lebuhn M., Liu F., Heuwinkel H. and Gronauer A., Biogas production from mono-digestion of maize silage-long-term process stability and requirements. In: *Water Science and Technology*, pp. 1645-1651 (2008).
51. Pobeheim H., Munk B., Johansson J. and Guebitz G.M., Influence of trace elements on methane formation from a synthetic model substrate for maize silage. *Bioresource Technology*, **101**, 836-839.
52. Preißler, Lemmer and Oechsner, Verfahren zur Biogaserzeugung. In: *Offenlegungsschrift zum Patent Nr. DE 10 2007 025 155 A1*, Deutsches Patent- und Markenamt, De (2008).
53. Lenz M. and Lens P.N.L., The essential toxin: The changing perception of selenium in environmental sciences. *Science of The Total Environment*, **407**, 3620-3633 (2009).
54. Lenz M., Janzen N. and Lens P.N.L., Selenium oxyanion inhibition of hydrogenotrophic and acetoclastic methanogenesis. *Chemosphere*, **73**, 383-388 (2008).
55. Chasteen T.G. and Bentley R., Biomethylation of selenium and tellurium: Microorganisms and plants. *Chemical Reviews*, **103**, 1-25 (2003).
56. Marques M.C., Coelho R., De Lacey A.L., Pereira I.A.C. and Matias P.M., The three-dimensional structure of [nifese] hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* hildenborough: A hydrogenase without a bridging ligand in the active site in its oxidised, "as-isolated" state. *Journal of Molecular Biology*, **396**, 893-907 (2010).
57. Ramhold D., persönliche Auskunft. ISF GmbH (2010).
58. Bertram P.A., Schmitz R.A., Linder D. and Thauer R.K., Tungstate can substitute for molybdate in sustaining growth of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Identification and characterization of a tungsten isoenzyme of formylmethanofuran dehydrogenase. *Archives of Microbiology*, **161**, 220-228 (1994).
59. O'Brien J.R., Raynaud C., Croux C., Girbal L., Soucaille P. and Lanzilotta W.N., Insight into the Mechanism of the B12-Independent Glycerol Dehydratase from *Clostridium butyricum*: Preliminary Biochemical and Structural Characterization. *Biochemistry*, **43**, 4635-4645 (2004).
60. Antipov A.N., Sorokin D.Y., L'Vov N.P. and Kuenen J.G., New enzyme belonging to the family of molybdenum-free nitrate reductases. *Biochemical Journal*, **369**, 185-189 (2003).

61. Hölker U., Lenz, J., Hemmungen in der Biogasanlage durch Kupfer und Zink-in der Praxis kein Thema. In: *Publikationsreihe Daten- und Modellbasierte Praxisempfehlungen*, Bioreact GmbH, Troisdorf (2008).
62. Vintiloiu A., Lemmer, A., Schlussbericht zum Vorhaben "Einsatz von Spurenelementen in NaWaRo-beschickten Biogasanlagen zum Ausgleich substratbedingter Mangelerscheinungen und zur Stabilisierung des Gärprozesses". Universität Hohenheim Landesanstalt für Agrartechnik und Bioenergie Hohenheim (2013).
63. *DIN EN 12880; Charakterisierung von Schlämmen : Bestimmung des Trockenrückstandes und des Wassergehalts*. Beuth Verlag, Berlin (2001).
64. *DIN EN 12879; Charakterisierung von Schlämmen: Bestimmung des Glühverlustes der Trockenmasse*. Beuth Verlag, Berlin (2001).
65. Weiland P. and Rieger C., Prozessstörungen frühzeitig erkennen. *Biogas Journal*, 18-20 (2006).
66. Deutsche Vereinigung für Wasser und Abwasser e.V. (DWA), *Leitfaden Nr. 2-7 Betrieb von Abwasseranlagen: Ermittlung der organischen Säuren durch Bestimmung der Kalkreserve im Faulwasser* (2004).
67. *Handbuch der Landwirtschaftlichen Versuchs- und Untersuchungsmethodik (VDLUFA-Methodenbuch) Band III*. Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten, Darmstadt (2007).
68. *DIN EN 15510: 2007-10 : Futtermittel - Bestimmung von Calcium, Natrium, Phosphor, Magnesium, Kalium, Eisen, Zink, Kupfer, Mangan, Cobalt, Molybdän, Arsen, Blei und Cadmium mittels ICP-AES*. Beuth Verlag, Berlin (2007).
69. Engler N., Merrettig-Bruns U., Feher A., Fritz T. and Nelles M., Prozessbewertung auf der Grundlage eines Aktivitätstests für standardisierte Substrate. In: 2. *VDI Konferenz Prozessmesstechnik an Biogasanlagen*, VDI Wissensforum GmbH Düsseldorf, Fulda, pp. 109-117 (2012).
70. Baehr H.D. and Kabelac S., *Thermodynamik : Grundlagen und technische Anwendungen* Springer, Berlin (2009).
71. *VDI-Wärmeatlas. [Berechnungsunterlagen für Druckverlust, Wärme- und Stoffübergang]*. Springer, Berlin [u.a.] (2006).
72. Rüschendorf L., *Mathematische Statistik*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg (2014).
73. MYSTAT 12. Systat Software Inc. , p. MYSTAT 12 // Student version of Systat (2007).
74. Linke B., Kinetic study of thermophilic anaerobic digestion of solid wastes from potato processing. *Biomass and Bioenergy*, **30**, 892-896 (2006).
75. Mähnert P., Kinetik der Biogasproduktion aus nachwachsenden Rohstoffen und Gülle. Dissertationsschrift, Humboldt-Universität Berlin, Berlin (2007).
76. Czeslik C.S., Heiko ; Winter, Roland, *Basiswissen Physikalische Chemie*. Vieweg und Teubner Verlag, Wiesbaden (2009).

77. Braunß H., *Grundkurs Mathematik in den Biowissenschaften*. Birkhäuser Verlag, Basel (2007).
78. MATLAB rel. 2013b.
79. Kuckartz U., *Statistik Eine verständliche Einführung*. Springer Verlag, Wiesbaden (2013).
80. Hashimoto A.G., Ammonia inhibition of methanogenesis from cattle wastes. *Agricultural Wastes*, **17**, 241-261 (1986).
81. Callander I.J. and Barford J.P., Precipitation, Chelation, and the Availability of Metals as Nutrients in Anaerobic Digestion. I. Methodology. *Biotechnology and Bioengineering*, **25**, 1947-1957 (1983).
82. Feher A., Entwicklung und praxisorientierte Bewertung einer Methode zur Untersuchung der Bioverfügbarkeit von Spurenelementen für die Biogasbildung- Aktueller Stand der Untersuchungen. *Vortrag auf dem Doktorandenkolloquium des Lehrstuhls Abfall- und Stoffstromwirtschaft der Universität Rostock* (2014).
83. Kabasci S., Merrettig-Bruns U., Loewen A., Feher A., Nelles M. and Engler N., Schlussbericht zum Vorhaben "Entwicklung eines Testsystems zur Bestimmung der biologischen Aktivität in Biogasfermentern und Bestimmung des Einflusses von Minorkomponenten auf die Biogasbildung - Minorkomponententest" im Rahmen des Programms zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung und -entwicklung (IGF). AiF / Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie (2012).
84. Callander I.J. and Barford J.P., Precipitation, Chelation, and the Availability of Metals as Nutrients in Anaerobic Digestion. II. Applications. *Biotechnology and Bioengineering*, **25**, 1959-1972 (1983).
85. Gustavsson J., Yekta S.S., Karlsson A., Skjellberg U. and Svensson B.H., Potential bioavailability and chemical forms of Co and Ni in the biogas process-An evaluation based on sequential and acid volatile sulfide extractions. *Engineering in Life Sciences*, **13**, 572-579 (2013).
86. Hu Q.H., Li X.F., Liu H., Du G.C. and Chen J., Enhancement of methane fermentation in the presence of Ni<sup>2+</sup> chelators. *Biochemical Engineering Journal*, **38**, 98-104 (2008).
87. Bhattacharya S.K., Madura R.L., Uberoi V. and Haghighi-podeh M.R., Toxic effects of cadmium on methanogenic systems. *Water Research*, **29**, 2339-2345 (1995).
88. Pearson F., Shiun-Chung C. and Gautier M., Toxic inhibition of anaerobic biodegradation. *Journal of the Water Pollution Control Federation*, **52**, 472-482 (1980).
89. Engler N., Merrettig-Bruns U., Feher A., Fritz T. and Nelles M., Prediction of Potentially Inhibiting Effects on Anaerobic Digestion Process. In: *4th International Symposium On Energy From Biomass And Waste*, IWWG-International Waste Working Group, Venice (2012).
90. Schmidt T., Nelles M., Scholwin F. and Pröter J., Trace element supplementation in the biogas production from wheat stillage - Optimization of metal dosing. *Bioresource Technology*, **168**, 80-85 (2014).

## Thesen

1. Die biologische Aktivität der Fermenterbiologie über die gesamte Abbaukette lässt sich durch eine zeitlich hoch aufgelöste Messung der Gasbildung aus einem standardisierten Substrat unter genormten Randbedingungen quantifizieren.

In der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Messung der Kinetik der Biogasbildung geeignet ist, um die Kinetik des Substratumsatzes zu quantifizieren. Das für die Messungen verwendete synthetische Standardsubstrat erfüllt die definierten Anforderungen hinsichtlich Bioverfügbarkeit, Abbaubarkeit und Reproduzierbarkeit vollständig. Einige Fermenterproben konnten das Substrat innerhalb von 7 d zu ca. 80 % umsetzen, einige wenige erreichten im selben Zeitraum Umsatzgrade von unter 50 %. Die gefundenen Unterschiede zwischen den untersuchten Fermenterproben lassen sich wegen der weitgehend konstanten Versuchs-Randbedingungen nur mit Unterschieden in der Leistungsfähigkeit der Fermenterbiologie erklären. Die in der Arbeit entwickelten und angewendeten Bewertungskriterien  $t_{50}$ ,  $t_{33}$  und  $s_2$  ermöglichen eine hinreichend differenzierte Quantifizierung der biologischen Aktivität und sind aus den Messdaten vergleichsweise einfach bestimmbar.

2. Die in der Arbeit entwickelte Methode zur zeitlich hoch aufgelösten Messung der Biogasbildung kann zur Messung der biologischen Aktivität entsprechend Punkt 1 angewendet werden.

Die dargestellten Ergebnisse der Validierungsversuche belegen, dass die Messmethodik unter Verwendung der beschriebenen Messgeräte reproduzierbare Versuchsergebnisse liefert. Die mit den drei verwendeten Sets des *ANKOM<sup>RF</sup> Gas Procuction Measurement System* gewonnenen Versuchsergebnisse zeigen eine ausreichende Mittelwerthomogenität. Somit konnten die im Laufe der Arbeit gewonnenen Ergebnisse einer gemeinsamen, einheitlichen Auswertung unterzogen werden. Unter Berücksichtigung aller Einflussfaktoren wurde eine versuchstypische relative Standardabweichung von 10 % ermittelt. Damit ist eine ausreichende Differenzierung der untersuchten Fermenterproben anhand der beschriebenen Bewertungskriterien möglich.

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass sich das methodische Konzept auch zur Klärung weiterer wissenschaftlicher Fragestellungen wie z.B. zur Detektion von Hemmwirkungen verschiedener Substanzen, nutzen lässt.

3. Durch Verwendung selektiver Substrate ist es möglich, die Abbauleistung einzelner Mikroorganismengruppen bzw. einzelne Phasen der Methangärung getrennt zu untersuchen.

Dies ist möglich, da die beteiligten Mikroorganismen die Stoffwechselprodukte der jeweils vorangegangenen Phasen als Ausgangsstoffe nutzen. Es konnte gezeigt werden, dass die im Experiment gemessene gestufte Biogasbildung aus reiner Maisstärke auf einen sukzessiven Ablauf der einzelnen Phasen der Methanbildung zurückzuführen ist. Die nahezu linearen Abschnitte der Gasbildungs-Summenkurve in den einzelnen Stufen konnten anhand der zeitlichen Veränderung des Gärsäuremusters der Hydrolyse/Versäuerung bzw. der Acetatbildung/Methanogenese zugeordnet werden. Die Anstiege der Gassummenkurve in diesen Bereichen wurden in Form der Bewertungsparameter  $s_1$  und  $s_2$  als Maß für die biologische Aktivität der jeweils beteiligten Mikroorganismengruppen herangezogen. Damit konnten auch Zielkonzentrationen für Spurenelemente bestimmt werden, die hauptsächlich in der Acetatbildung/Methanogenese von Bedeutung sind.

4. Aus der Messung der biologischen Aktivität einer großen Anzahl von Fermenterproben und den gefundenen Spurenelementkonzentrationen lassen sich statistisch gesicherte Aussagen zu Zielkonzentrationen ableiten.

Es war ausdrückliches Ziel der Arbeit, nicht Bedarfswerte im eigentlichen Sinne, sondern die in einem Biogasfermenter einzustellenden Ziel- oder Richtkonzentrationen für die einzelnen Spurenelemente zu ermitteln. Die Verteilung in bioverfügbare und nicht bioverfügbare Anteile wird dabei als im Mittel etwa gleich vorausgesetzt. Dies führt im Zweifelsfall zu einer Überbewertung der Spurenelementversorgung, da z.B. die in Sulfiten stark gebundenen Metallionen zwar analytisch nachgewiesen werden, für den Stoffwechsel der Mikroorganismen jedoch nicht zur Verfügung stehen.

Mit dem synthetischen Standardsubstrat wurden Versuche mit über 70 Fermenterproben durchgeführt und Zusammenhänge zwischen der biologischen Aktivität und der Konzentration von 10 essentiellen Spurenelementen untersucht. Für die Elemente Cu, Ni, Zn, Fe, B, Mn, Mo, und W konnte gezeigt werden, dass die Unterschreitung einer bestimmten Konzentrationsschwelle mit einem sprunghaften Anstieg des Parameters  $t_{33}$  verbunden ist. Diese Konzentrationsschwelle wurde als Zielkonzentration definiert. Für die essentiellen Spurenelemente Se und Co konnten Zielkonzentrationen anhand der Versuche mit reiner Maisstärke und unter Auswertung des Parameters  $s_2$  definiert werden.



## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt und zu ihrem Gelingen beigetragen haben.

Meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Michael Nelles danke ich für die wissenschaftliche Begleitung während der Arbeit.

Dem gesamten Laborteam der ISF GmbH danke ich für die stets zuverlässige und schnelle Ausführung der Spurenelementanalysen, die einen zentralen Teil dieser Arbeit ausmachen.

Mein besonderer Dank gilt der H. Wilhelm Schaumann Stiftung, durch deren großzügige Spende die vorliegende Arbeit überhaupt erst ermöglicht wurde.

Rostock, Oktober 2014

# Anhang

## Abbildungen und Tabellen

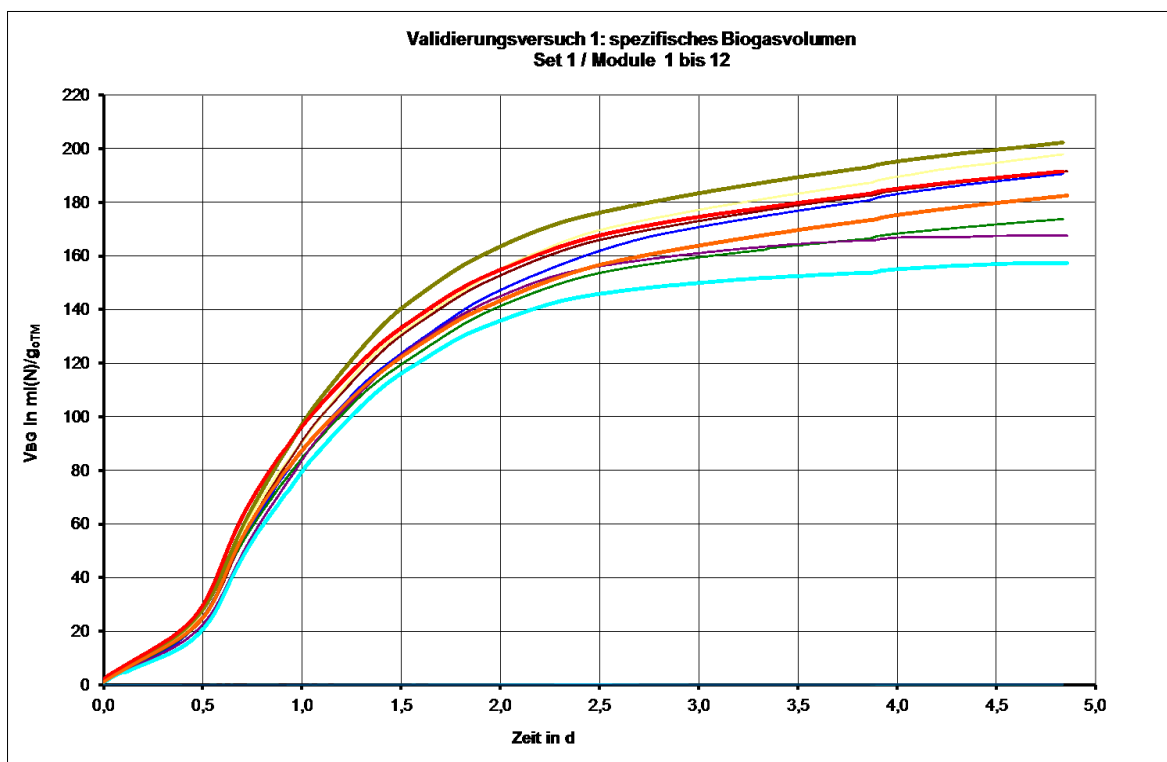


Abbildung A 1: spezifische Biogaserträge im Validierungsversuch Nr. 1: Set 1, 12 Module

Inokulum: Faulschlamm aus kommunaler Kläranlage

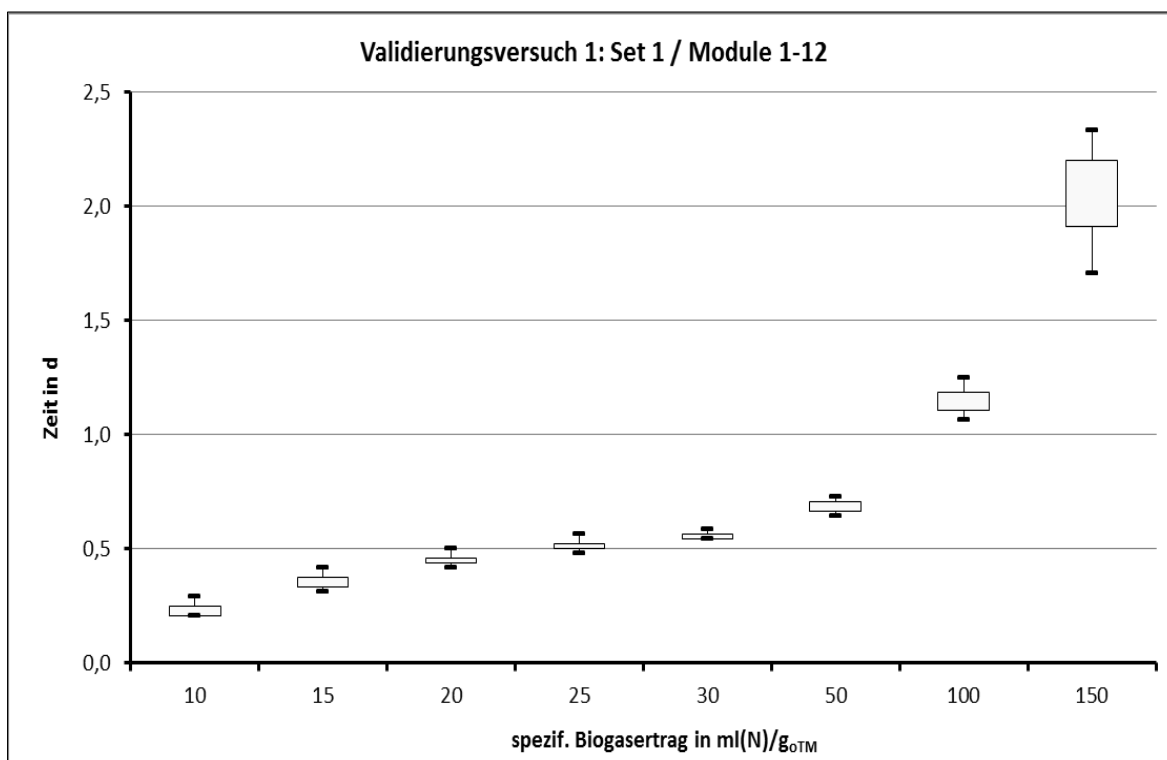


Abbildung A 2: Boxplot zum Validierungsversuch Nr. 1: Set 1, 12 Module

Inokulum: Faulschlamm aus kommunaler Kläranlage

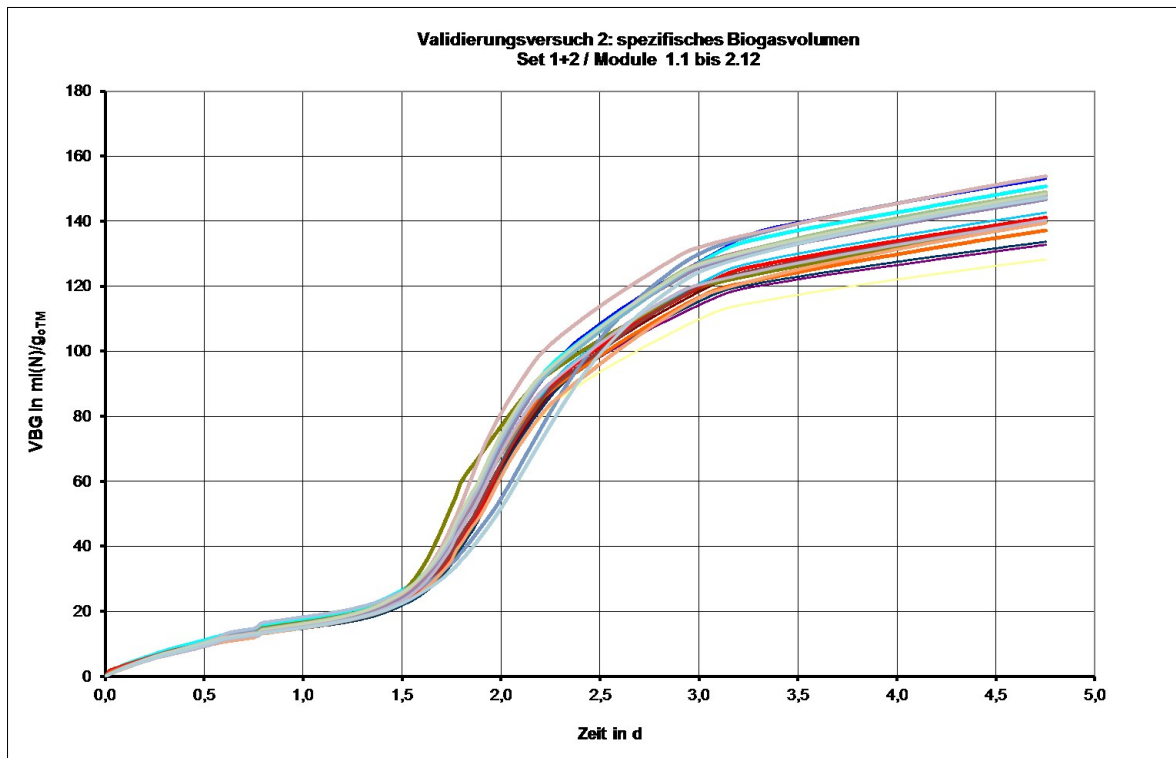


Abbildung A 3: spezifische Biogaserträge im Validierungsversuch Nr.2 : Set 1 + 2, 24 Module

Inokulum: Faulschlamm aus kommunaler Kläranlage

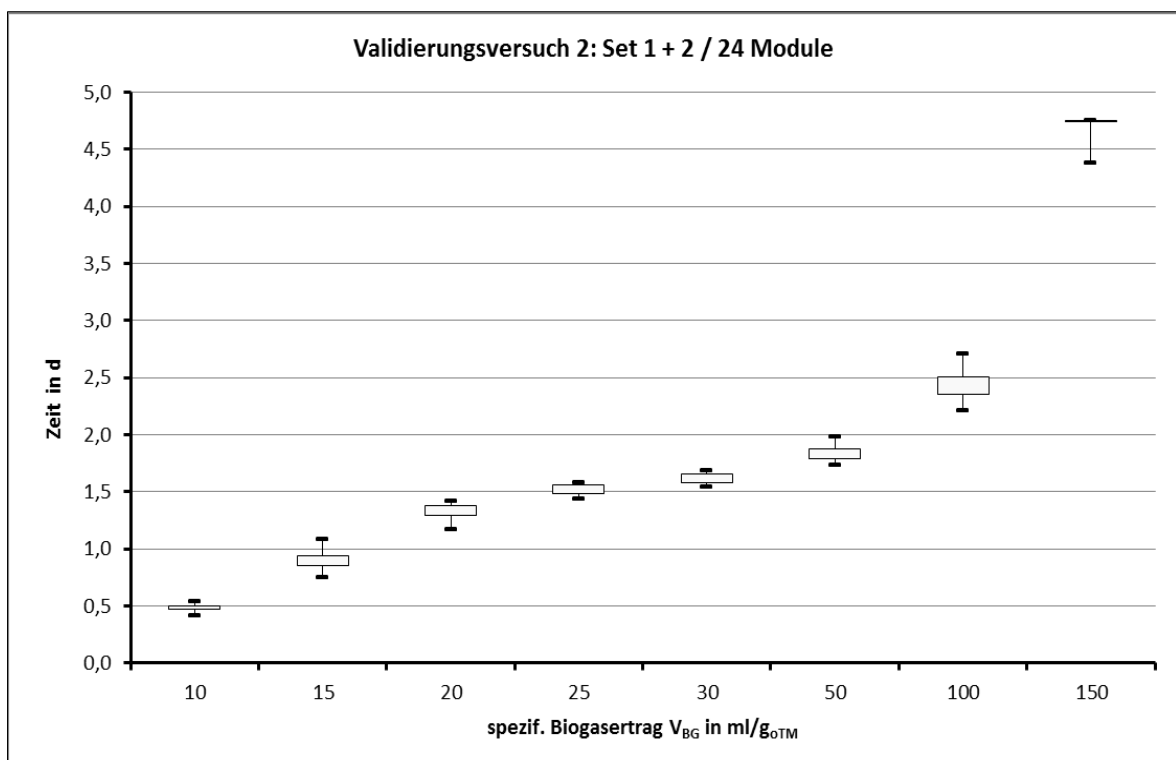


Abbildung A 4: Boxplot zum Validierungsversuch Nr. 2: Set 1+2, 24 Module

Inokulum: Faulschlamm aus kommunaler Kläranlage

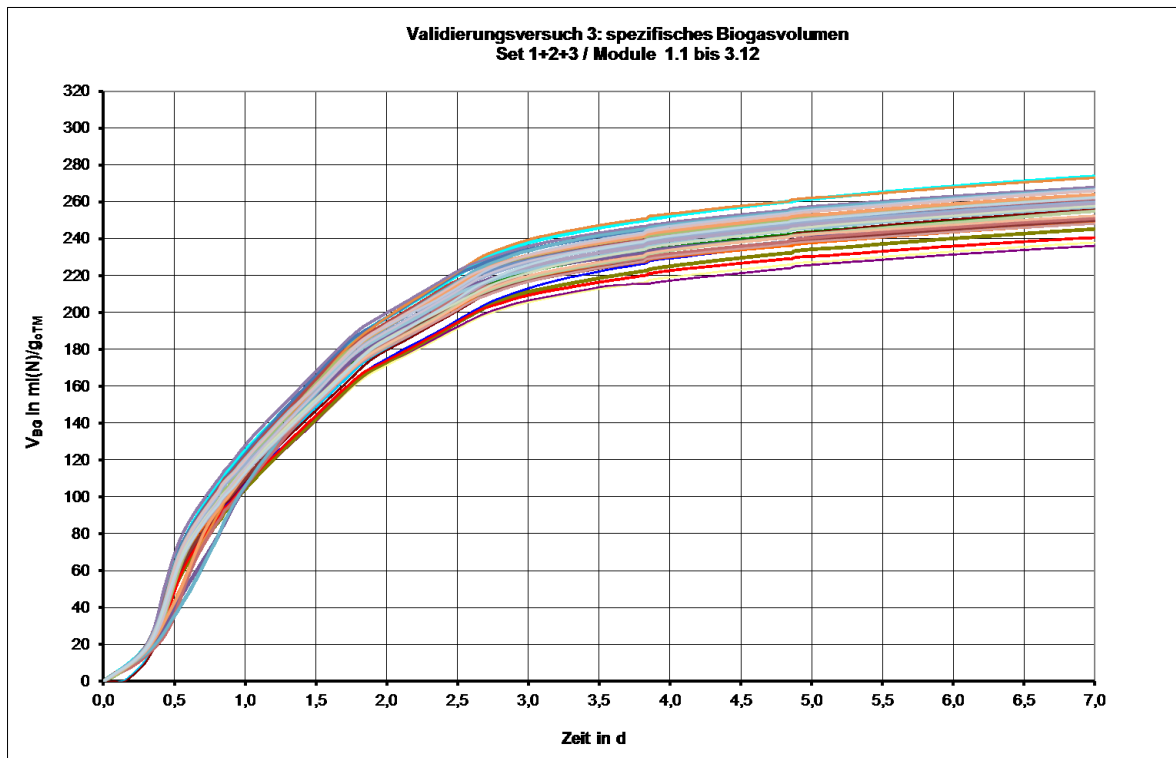


Abbildung A 5: spezifische Biogaserträge im Validierungsversuch Nr.3 : Set 1+2+3, 36 Module

Inokulum: Fermenterinhalt einer landwirtschaftlichen BGA

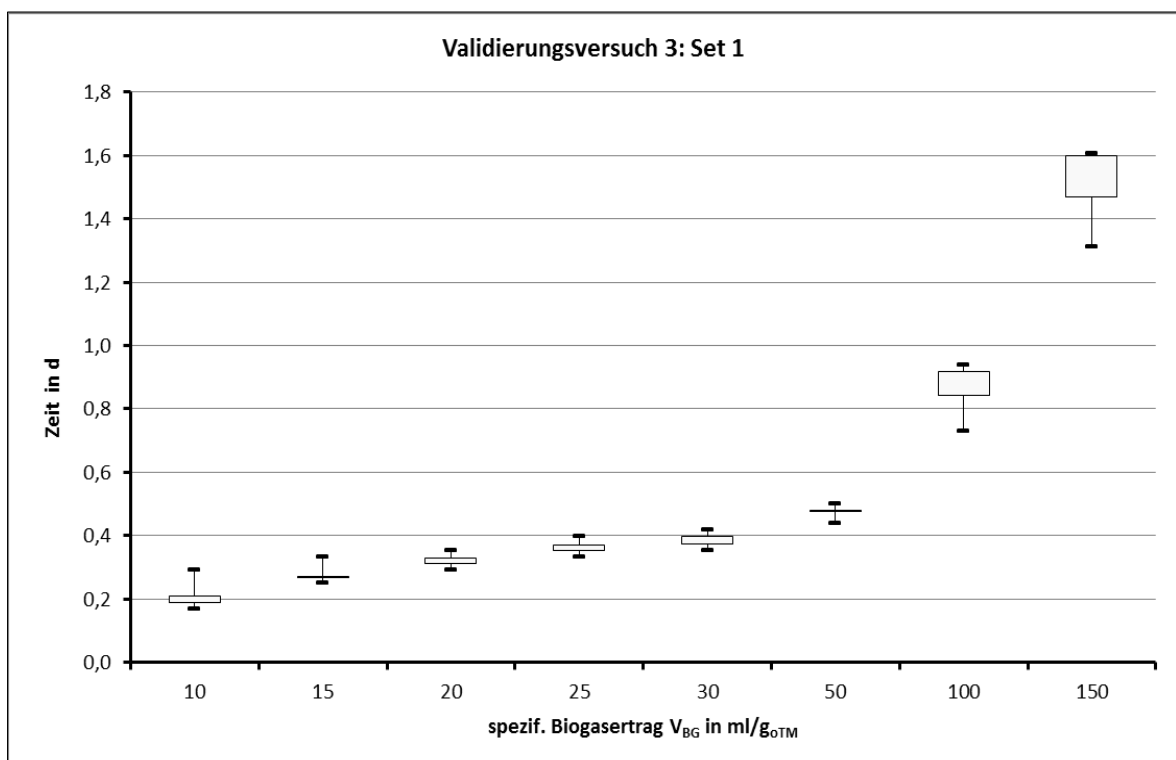


Abbildung A 6: Boxplot zum Validierungsversuch Nr. 3: Set 1, 12 Module

Inokulum: Fermenterinhalt einer landwirtschaftlichen BGA

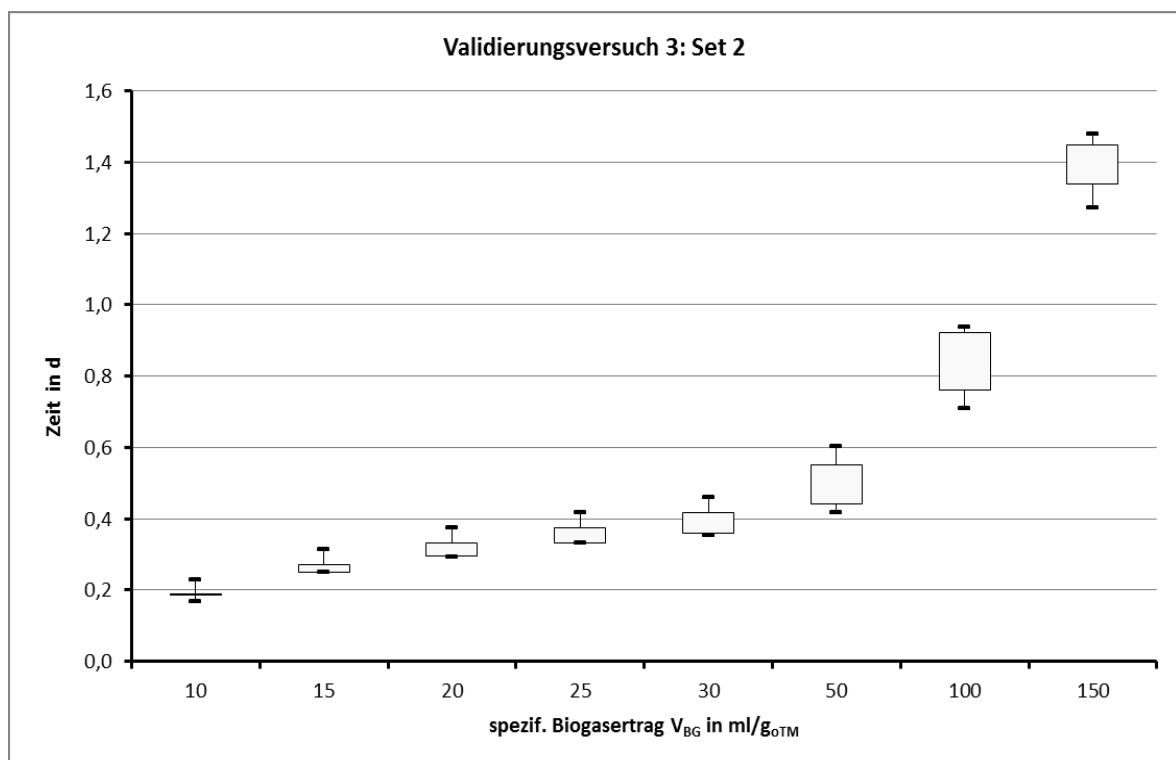


Abbildung A 7: Boxplot zum Validierungsversuch Nr. 3: Set 2, 12 Module

Inokulum: Fermenterinhalt einer landwirtschaftlichen BGA

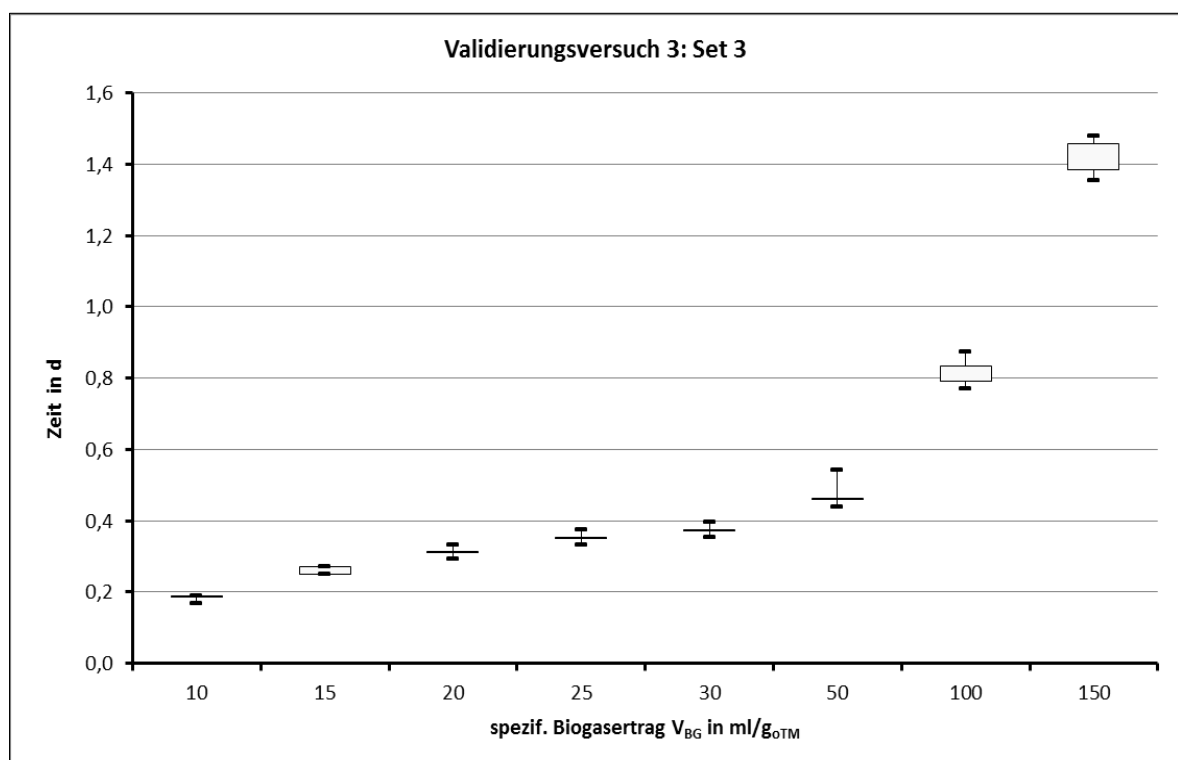


Abbildung A 8: Boxplot zum Validierungsversuch Nr. 3: Set 3, 12 Module

Inokulum: Fermenterinhalt einer landwirtschaftlichen BGA

Tabelle A 1: Zusammenfassung der Analysenergebnisse der untersuchten Fermenterproben:  
Grundparameter (leere Zellen: nicht bestimmte Werte)

Proben-ident.-Nr	TS	oTS	gesamt- N	NH <sub>4</sub> -N	FOS/TAC	P	K	Mg	Na	Ca	S
	% d. FM					mg/kg TM					
061-08	4,9%	3,5%				1,43	7,23	1,06	1,08	3,17	0,98
062-08	4,4%	3,3%	0,37%	0,23%		1,22	5,71	0,81	0,52	2,00	0,94
063-08	3,6%	2,5%	0,34%	0,28%		0,95	9,02	0,65	0,88	1,83	0,92
064-08	9,4%	7,3%	0,57%	0,26%		1,25	4,41	0,83	0,35	2,08	0,70
002-09	3,5%	2,2%			0,15	1,51	6,24	1,27	1,42	6,35	0,75
003-09	8,7%	6,7%	0,37%	0,20%	0,17	1,27	6,07	0,49	0,18	1,26	0,55
004-09	3,3%	2,3%	0,45%	0,39%	0,12	1,81	5,40	1,09	1,00	2,42	0,92
005-09	11,5%	8,5%	0,57%	0,27%	0,15	1,17	3,89	0,53	0,14	4,21	0,49
006-09	6,1%	5,2%			0,12	1,05	4,53	0,76	0,33	1,81	0,54
007-09	12,1%	7,1%	0,43%	0,23%	0,34	2,29	2,63	1,13	0,21	3,18	0,34
010-09	5,1%	4,3%	0,24%		0,23	1,96	4,66	0,64	0,52	1,09	0,46
011-09	5,6%	4,4%	0,25%		0,31	2,34	5,14	0,98	0,75	1,76	0,59
016-09	7,7%	5,8%	0,60%	0,17%	0,08	1,03	5,79	0,78	0,33	1,84	0,62
017-09	6,1%	4,6%	0,37%	0,18%	0,09	1,05	4,53	0,90	0,49	3,32	0,57
020-09	4,0%	2,7%	0,13%		0,10	1,27	6,63	1,23	1,19	3,37	0,78
021-09	5,9%	4,4%	0,18%		0,10	1,01	4,75	0,89	0,51	3,16	0,61
022-09	8,1%	6,2%	0,43%	0,14%	0,15	0,99	6,28	1,08	0,90	3,08	1,48
023-09	2,4%	1,7%	0,15%	0,14%	0,50	1,05	4,62	0,66	0,52	1,96	0,57
025-09	10,1%	8,4%	0,50%	0,24%	0,86	0,84	3,71	0,51	0,16	0,85	0,33
028-09	6,5%	5,3%	0,21%		0,12	0,84	4,01	0,65	0,33	1,72	0,59
029-09	6,5%	5,4%	0,21%		0,10	0,91	4,25	0,71	0,34	1,36	0,63
030-09	6,2%	4,8%	0,19%		0,10	1,19	3,78	0,68	0,29	3,06	0,62
031-09	10,4%	7,9%			0,14	0,87	3,90	0,57	0,48	1,59	0,56
032-09	10,7%	8,5%	0,27%		0,24	1,33	4,35	0,64	0,18	1,51	0,51
033-09	7,8%	5,5%	0,23%		0,12	1,06	4,57	0,75	0,71	2,03	0,76
040-09	6,6%	5,4%	0,41%	0,27%	0,27	1,17	4,87	0,54	0,43	1,15	0,50
057-09	3,2%	2,1%	0,30%	0,22%	0,17	1,41	9,04	0,82	1,01	2,15	0,81
058-09	4,8%	3,4%	0,39%	0,24%	0,17	1,27	7,55	0,74	0,61	1,77	0,69
059-09	10,0%	7,7%			0,19	0,96	4,18	0,41	0,11	3,80	0,38
070-09	9,7%	8,1%	0,42%		0,20	0,75	3,37	0,30	0,03	0,69	0,36
071-09	9,5%	7,8%	0,25%		0,22	0,96	3,83	0,39	0,03	0,85	0,40
073-09	8,3%	6,6%	0,50%	0,20%	0,19	1,15	4,65	0,64	0,23	1,14	0,49
074-09	7,6%	5,8%	0,00%		0,18	0,93	4,65	0,39	0,17	0,81	0,42
078-09	0,0%	0,0%	0,48%	0,23%		0,78	4,07	0,28	0,03	0,73	0,37
079-09	0,0%	0,0%				0,71	4,27	0,23	0,03	0,75	0,39
081-09	10,9%	8,8%	0,29%		0,19	1,02	4,07	0,42	0,13	1,03	0,47
082-09	10,5%	8,4%	0,28%		0,17	1,03	3,92	0,41	0,13	1,07	0,47
084-09	9,1%	7,5%			0,41	0,77	4,61	0,27	0,02	0,83	0,39
085-09	10,7%	8,6%			0,24	0,86	3,74	0,39	0,12	0,97	0,37
115-09	14,8%	12,0%	0,34%		0,40	0,81	3,05	0,34	0,11	1,09	0,38
116-09	9,1%	7,5%			0,30	0,81	4,20	0,28	0,02	0,81	0,43
188-09	0,0%	0,0%				0,80	4,80	0,31	0,03	0,92	0,41
197-09	0,0%	0,0%			0,25	0,76	4,72	0,29	0,03	0,85	0,40
199-09	7,7%	5,9%			0,19	1,01	4,36	0,66	0,29	1,67	0,52
204-09	8,6%	7,0%	0,53%	0,27%	0,24	0,72	3,95	0,25	0,02	0,79	0,39
221-09	12,8%	10,7%			1,85	0,90	4,12	0,26	0,03	0,53	0,31
222-09	5,9%	4,4%	0,18%		0,18	1,13	5,68	0,62	0,42	1,55	0,66
224-09	7,8%	6,4%	0,48%	0,26%	0,38	0,75	4,83	0,28	0,05	0,92	0,40

(Fortsetzung)

Proben-ident.-Nr	TS	oTS	gesamt- N	NH <sub>4</sub> -N	FOS/TAC	P	K	Mg	Na	Ca	S
	% d. FM					mg/kg TM					
225-09	6,1%	4,6%	0,36%	0,21%	0,16	1,02	4,60	0,83	0,81	2,52	0,70
226-09	7,3%	5,9%	0,52%	0,25%	0,38	0,79	4,79	0,32	0,04	0,89	0,38
237-09	12,2%	10,1%	0,33%		0,23	0,89	4,78	0,39	0,05	0,83	0,44
238-09	11,7%	9,7%	0,32%		0,22	0,89	4,99	0,38	0,05	0,84	0,44
239-09	8,7%	6,7%			0,18	0,85	5,69	0,40	0,14	1,17	0,44
251-09	7,5%	6,0%	0,49%	0,23%	0,33	0,82	5,00	0,39	0,02	0,93	0,40
256-09	8,5%	6,9%	0,55%	0,26%	0,30	0,85	4,85	0,38	0,04	0,99	0,41
262-09	10,0%	8,4%	0,26%	0,25%	0,40	0,78	4,41	0,35	0,03	0,88	0,37
289-09	10,5%	8,8%	0,59%	0,27%	0,47	0,56	4,09	0,33	0,03	0,82	0,28
005-10	10,0%	8,0%	0,70%	0,33%	0,38	0,89	4,49	0,37	0,03	0,92	0,41
006-10	10,4%	8,4%			0,41	0,80	3,96	0,46	0,09	1,06	0,46
013-10	8,7%	7,1%			0,40	0,87	5,41	0,32	0,03	0,93	0,42
043-10	9,3%	7,6%			0,19	0,98	4,84	0,52	0,07	1,04	0,49
044-10	9,8%	8,1%			0,39	0,89	4,80	0,37	0,03	0,87	0,41
049-10	7,0%	5,6%			0,19	0,86	4,62	0,52	0,11	1,11	0,44
050-10	6,8%	5,4%			0,20	0,93	5,15	0,58	0,16	1,23	0,47
089-10	7,5%	5,8%			0,16	0,57	5,38	0,89	0,33	2,04	0,32
091-10	6,1%	4,8%			0,13	0,86	4,82	0,78	0,50	1,54	0,64
093-10	9,1%	7,3%			0,43	0,84	3,83	0,48	0,11	1,14	0,48
104-10	7,1%	5,5%			0,16	0,82	4,29	0,50	0,10	1,02	0,40
106-10	11,1%	9,4%			0,62	0,69	3,91	0,25	0,04	0,65	0,33
117-10	6,2%	4,8%			0,81	0,91	7,48	0,10	0,06	0,91	0,49
118-10	7,8%	6,3%			0,35	0,82	4,05	0,53	0,08	1,14	0,39
119-10	9,0%	6,7%			0,22	1,23	4,45	0,41	0,17	2,88	0,59
165-10	10,8%	8,4%	0,68%	0,47%	0,13	1,02	5,69	0,50	0,31	1,13	0,39
166-10	8,2%	6,2%	0,54%	0,29%	0,19	0,95	4,76	0,60	0,28	1,76	0,47
171-10	3,5%	2,2%	0,27%	0,27%	0,13	1,76	8,02	0,77	2,00	2,74	0,73
007-11	11,5%	8,7%			0,31	0,88	5,05	0,74	0,30	1,92	0,55
034-11	6,5%	5,4%	0,37%	0,14%	0,56	0,81	4,07	0,47	0,05	1,04	0,35
037-11	7,0%	5,2%			0,21	0,98	5,29	0,64	0,08	1,87	0,46
039-11	7,5%	5,6%	0,42%	0,14%	0,20	1,04	5,17	0,67	0,07	1,84	0,48
063-11	6,1%	4,7%	0,44%	0,18%	0,19	1,18	5,22	0,77	0,34	2,44	0,57
065-11	6,4%	4,7%	0,30%	0,16%	0,40	0,84	3,86	0,89	0,65	3,94	0,60
066-11	8,7%	7,2%	0,48%	0,22%	0,56	0,69	4,49	0,52	0,22	1,12	0,40
067-11	8,7%	6,6%	0,49%	0,30%	0,29	1,08	5,39	0,76	0,33	1,80	0,49
081-11	7,0%	5,7%			0,26	0,73	4,41	0,48	0,08	1,07	0,37
090-11	8,0%	6,3%	0,48%	0,23%	0,19	0,91	4,04	0,68	0,28	1,12	0,49
091-11	7,7%	5,7%	0,46%	0,28%	0,18	0,82	4,80	0,83	1,58	2,17	0,61
092-11	4,3%	3,3%	0,34%	0,19%	0,18	1,11	4,33	0,97	0,50	2,20	0,66



# Anhang

## Spurenelementkonzentrationen und biologische Aktivität in NaWaRo-Biogasfermentern

Tabelle A 2: Zusammenfassung der Analysenergebnisse der untersuchten Fermenterproben: Spurenelementanalytik und Bewertungskriterien

n.e. : Bewertungskriterium wurde innerhalb der maximalen Versuchsdauer von 7 d nicht erreicht.

\* Bei nicht angegebenen Werten wurde mit dem betreffenden Standardsubstrat kein Versuch durchgeführt.

Proben-ident.-Nr	Spurenelementanalytik										synth. Standardsubstrat*		Maisstärke*
	Cu	Ni	Zn	Fe	B	Co	Mn	Mo	Se	W	t <sub>50</sub>	t <sub>33</sub>	
	mg/kgTM										d		
061-08	330,8	11,0	366,4	7.063,0	55,51	2,90	459,0	5,23	1,43	1,25	2,52	1,90	
062-08	182,2	10,1	338,9	8.624,0	66,24	2,77	485,3	4,46	0,73	1,05	2,86	2,04	
063-08	176,7	7,5	346,1	7.815,0	69,75	2,38	452,4	4,87	0,81	1,04	3,73	2,88	
064-08	44,9	7,5	238,4	1.917,0	49,66	1,33	278,9	4,57	0,84	1,04	3,96	2,65	
002-09	241,2	10,5	549,4	1.463,0	53,32	2,79	432,5	4,84	1,74	3,30			
003-09	68,0	7,2	173,8	3.459,0	21,09	1,36	206,8	3,82	0,31	1,03	3,94	3,04	
004-09	158,6	10,5	1.956,0	4.624,2	43,57	4,93	831,6	4,78	1,98	11,62	3,00	1,90	
005-09	53,3	8,7	198,0	2.359,0	22,62	1,92	340,0	3,23	0,37	1,15	2,21	1,29	
006-09	98,2	5,8	215,0	3.925,0	27,32	1,86	339,5	2,97	0,57	1,25	2,02	1,19	
007-09	230,9	17,8	428,4	2.510,0	21,00	1,35	478,6	3,54	0,47	2,55	n.e.	4,86	
010-09	91,9	6,5	390,2	1.037,0	25,15	2,27	214,2	4,00	0,76	2,41	4,71	3,13	
011-09	184,6	6,0	686,8	1.006,0	41,91	2,03	327,3	4,38	1,12	3,87	3,54	2,08	
016-09	213,4	7,8	167,0	2.371,0	28,42	1,63	248,2	4,33	0,55	0,91	1,65	1,00	
017-09	77,1	7,5	334,0	1.840,0	37,56	1,55	393,7	3,58	1,13	1,85	2,46	1,54	
020-09	337,0	11,9	495,1	2.066,0	51,34	3,97	465,8	5,49	1,25	2,71	1,81	1,13	
021-09	100,1	6,5	341,4	1.708,2	41,15	1,57	391,6	3,59	1,14	1,96	1,94	1,23	
022-09	3024,0	39,0	386,0	2.062,8	68,61	2,44	354,6	4,00	1,97	2,12	1,46	0,90	
023-09	58,2	14,6	217,0	2.142,2	29,32	1,93	393,0	4,16	1,06	1,21	n.e.	5,81	
025-09	19,7	3,7	127,3	1.504,4	13,30	0,40	285,9	2,10	0,58	0,70	n.e.	5,75	
028-09	129,1	10,0	342,7	5.688,0	21,51	1,95	733,8	3,65	0,46	2,24	1,06	0,63	
029-09	135,4	9,9	396,0	5.001,0	24,04	1,91	596,8	3,74	0,86	2,40	0,92	0,54	
030-09	167,9	10,5	185,1	1.718,0	30,22	1,14	271,7	4,48	0,64	1,20	1,40	0,85	
031-09	38,9	12,2	140,5	1.865,0	22,84	0,95	269,8	2,98	0,33	0,92			
032-09	48,5	16,0	210,2	1.873,0	22,87	3,11	344,3	5,20	0,71	1,39	4,00	2,27	
033-09	272,6	13,4	275,5	7.789,0	31,98	3,00	556,2	4,32	1,24	2,02	1,94	1,19	

# Anhang

## Spurenelementkonzentrationen und biologische Aktivität in NaWaRo-Biogasfermentern

(Fortsetzung)

Proben-ident.-Nr	Spurenelementanalytik										synth. Standardsubstrat*		Maisstärke*
	Cu	Ni	Zn	Fe	B	Co	Mn	Mo	Se	W	t <sub>50</sub>	t <sub>33</sub>	
	mg/kgTM										d		s <sub>2</sub>
040-09	156,8	25,7	380,1	1.246,0	39,10	1,55	255,3	2,90	1,02	2,41	3,94	2,52	
057-09	343,0	10,1	706,0	2.141,0	44,34	2,67	398,7	3,28	1,10	4,69	1,85	1,23	
058-09	176,8	8,0	481,9	2.346,0	37,40	1,69	344,2	4,02	0,21	3,18	3,38	2,08	
059-09	20,4	6,6	117,6	2.568,0	16,14	0,41	163,5	2,33	0,00	0,75		n.e.	
070-09	25,2	8,9	84,5	875,4	13,84	7,19	102,0	3,79	2,06	0,63	n.e.	5,09	
071-09	23,4	5,6	84,0	916,4	14,59	4,67	114,8	3,09	1,24	0,64	4,75	2,46	
073-09	32,0	10,2	150,4	2.070,8	18,61	1,51	274,4	5,23	0,56	1,15	1,58	0,98	
074-09	22,5	9,6	126,7	2.822,2	14,86	1,73	284,4	4,02	0,68	1,09	2,25	1,44	
078-09	24,4	11,3	82,1	923,2	13,77	7,23	100,3	4,53	2,16	0,71			
079-09	32,3	6,2	86,4	897,2	14,97	6,77	101,8	3,87	2,00	0,73			
081-09	37,5	13,2	158,2	1.700,7	20,69	2,30	240,6	4,95	0,67	1,26	1,58	0,98	
082-09	36,1	12,5	159,0	1.596,3	21,70	2,33	243,5	4,70	0,70	1,30	2,19	1,42	
084-09	22,7	2,5	101,2	1.043,3	12,14	6,46	114,5	3,25	1,64	0,84	n.e.	3,77	
085-09	18,8	5,0	119,7	1.483,3	13,67	1,14	255,7	2,64	0,43	0,90		n.e.	
115-09	15,6	4,5	110,0	962,9	15,76	0,90	208,8	2,04	0,40	0,90	n.e.	6,48	
116-09	24,2	3,6	110,2	1.413,3	13,63	8,65	130,3	3,39	2,30	0,83	5,50	3,40	
188-09	28,0	2,7	124,1	1.511,7	13,46	9,27	132,6	4,27	2,82	1,20			
197-09	25,4	2,6	106,3	1.298,3	13,39	7,26	118,6	3,73	2,18	1,03			
199-09	116,1	4,9	183,0	3.951,7	22,58	2,28	396,5	2,29	0,74	2,90	2,10	1,27	
204-09	24,1	2,4	104,1	1.191,7	12,61	6,42	122,4	3,21	1,70	0,95	4,27	2,71	
221-09	15,9	1,6	71,2	1.413,0	8,19	0,45	85,2	2,05	0,10	1,20		n.e.	
222-09	116,9	4,0	267,3	2.185,3	25,33	1,82	271,0	3,86	1,00	1,64	3,11	1,75	
224-09	26,8	2,8	114,7	1.293,0	16,85	6,07	133,7	3,54	1,69	1,00	3,58	2,19	
225-09	318,5	5,8	394,7	2.665,7	30,02	2,66	387,4	3,10	1,84	2,04	1,90	1,00	
226-09	24,4	2,6	110,1	1.179,8	17,63	8,86	138,5	3,71	2,68	0,94	5,52	2,94	
237-09	24,8	9,5	140,7	1.837,2	21,02	2,12	219,7	3,97	0,69	0,80	n.e.	2,73	
238-09	22,5	10,4	145,0	1.780,2	22,21	1,82	228,1	4,29	0,67	0,73	2,17	1,15	
239-09	22,2	4,8	94,0	1.006,5	19,22	1,48	124,7	3,23	0,36	0,40			
251-09	24,1	2,9	119,5	1.093,7	22,73	7,19	128,4	3,64	2,17	0,34	n.e.	6,81	

(Fortsetzung)

Proben-ident.-Nr	Spurenelementanalytik										synth. Standardsubstrat*		Maisstärke*
	Cu	Ni	Zn	Fe	B	Co	Mn	Mo	Se	W	t <sub>50</sub>	t <sub>33</sub>	s <sub>2</sub>
	mg/kgTM										d		
256-09	23,8	2,6	116,4	1.127,3	22,96	5,74	131,5	3,61	1,92	0,42	n.e.	6,90	
262-09	23,5	2,2	106,4	850,0	19,24	4,61	121,2	3,41	1,44	0,16	n.e.	5,02	
289-09	22,0	1,9	105,1	652,8	16,88	6,47	112,7	2,61	2,22	0,24	3,50	2,08	
005-10	24,3	2,0	127,6	882,7	18,62	6,05	134,2	3,46	1,54	0,29	3,90	2,31	
006-10	23,7	4,7	196,7	7.730,7	18,60	5,54	178,5	3,11	1,17	0,81	3,19	2,02	
013-10	26,1	2,1	141,5	1.080,2	19,85	8,81	141,4	4,14	2,42	0,36	n.e.	3,61	0,32
043-10	25,6	11,9	130,7	2.012,5	23,35	2,26	211,2	4,64	0,55	0,60			0,21
044-10	23,8	1,9	125,8	1.105,5	18,00	5,31	130,5	3,66	1,48	0,29	n.e.	4,27	
049-10	28,8	2,7	140,5	1.272,8	24,24	9,77	213,7	2,87	2,34	0,43	3,38	1,90	0,33
050-10	30,1	2,9	144,7	1.550,5	27,92	7,05	240,2	7,02	1,30	0,84	4,00	2,06	0,34
089-10	85,2	3,7	178,4	3.187,3	21,67	1,20	303,9	1,36	0,64	0,83	1,33	0,88	0,29
091-10	160,0	6,5	390,3	5.098,0	30,86	1,23	283,9	2,83	1,04	1,55	1,38	0,92	0,33
093-10	28,2	4,9	253,1	7.257,0	19,65	5,31	179,9	2,92	1,41	2,13	3,31	2,10	0,14
104-10	21,5	3,2	111,4	1.249,3	21,65	9,87	196,3	2,84	2,74	0,46			0,16
106-10	20,3	1,4	113,9	814,8	18,12	16,28	101,9	4,23	4,23	0,34			
117-10	28,8	5,5	219,2	2.288,2	21,13	0,64	104,9	3,36	0,43	0,77			0,01
118-10	34,5	2,1	97,0	991,5	18,54	1,00	170,9	2,49	0,86	0,33			0,14
119-10	38,0	4,3	217,4	3.393,8	25,20	3,83	516,0	3,36	1,35	1,03			0,19
165-10	47,8	3,1	289,3	1.124,0	20,35	0,85	215,9	3,77	0,50	0,15	3,42	2,04	0,09
166-10	231,1	11,9	253,3	2.102,8	29,49	2,02	214,2	4,09	0,37	0,50	2,61	1,69	0,19
171-10	325,7	11,5	884,2	1.987,8	61,71	5,13	611,4	7,59	3,17	1,23	2,06	1,31	

(Fortsetzung)

Proben-ident.-Nr	Spurenelementanalytik										synth. Standardsubstrat*		Maisstärke*
	Cu	Ni	Zn	Fe	B	Co	Mn	Mo	Se	W	t <sub>50</sub>	t <sub>33</sub>	s <sub>2</sub>
	mg/kgTM										d		
007-11	69,9	6,6	246,8	2.215,3	24,83	1,94	295,0	2,91	0,57	0,70	6,34	2,61	0,08
034-11	21,7	2,1	84,0	825,2	12,19	4,04	139,9	2,68	1,97	0,42	3,73	2,23	0,09
037-11	21,5	5,2	129,6	2.288,2	19,80	9,81	257,1	2,83	2,16	0,88	2,46	1,21	0,22
039-11	21,5	7,0	127,5	2.352,3	20,83	9,12	254,3	2,70	1,91	0,87			0,20
063-11	53,5	4,0	193,0	1.392,7	30,21	4,64	308,4	3,22	1,20	0,65	1,35	0,77	
065-11	281,4	9,0	233,0	7.309,0	41,64	2,02	385,1	3,22	0,96	3,90	n.e.	1,54	0,20
066-11	56,7	1,8	122,7	1.652,0	20,27	0,45	142,4	1,88	0,27	0,89	4,86	2,48	0,06
067-11	39,7	3,3	181,7	1.616,8	33,69	0,93	230,6	3,21	0,74	1,00	3,73	2,33	0,15
081-11	36,0	2,1	81,1	1.109,7	17,17	3,18	129,5	2,84	1,21	0,66			
090-11	130,4	4,4	169,4	1.146,6	25,00	1,48	247,3	0,71	0,65	0,89	1,50	0,83	0,31
091-11	88,9	3,2	223,9	2.254,7	25,55	2,68	502,9	0,68	0,90	0,92	2,46	1,42	0,10
092-11	714,7	9,5	441,0	1.605,0	38,39	2,53	357,2	1,44	1,44	0,98	1,17	0,67	0,38

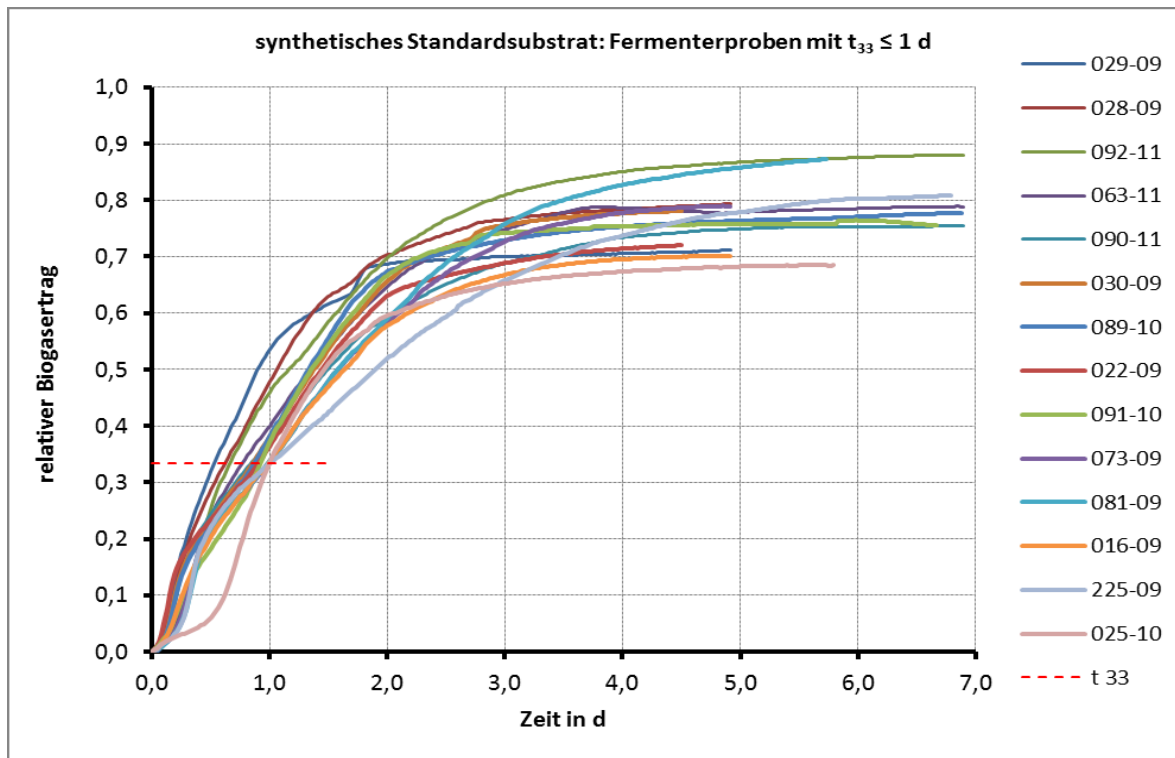


Abbildung A 9: Versuche mit synthetischem Standardsubstrat; normierte Gasbildungskurven der Fermenterproben mit  $t_{33} \leq 1$  d

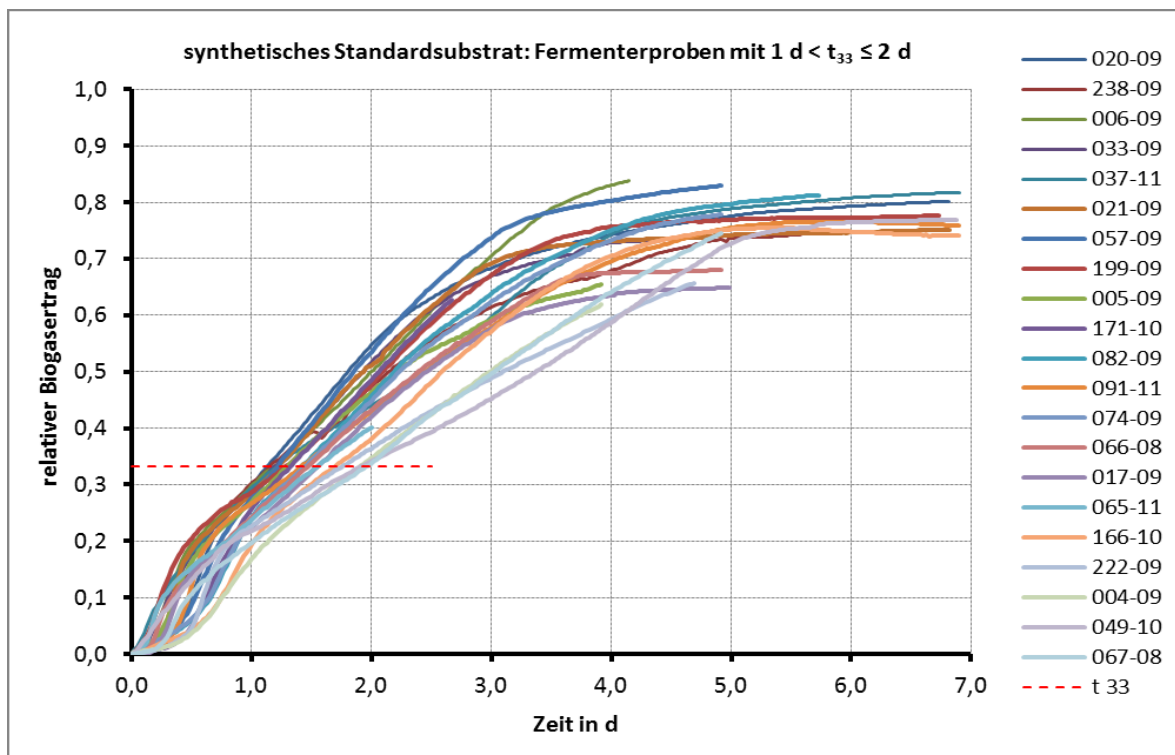


Abbildung A 10: Versuche mit synthetischem Standardsubstrat; normierte Gasbildungskurven der Fermenterproben mit  $1 \text{ d} < t_{33} \leq 2$  d

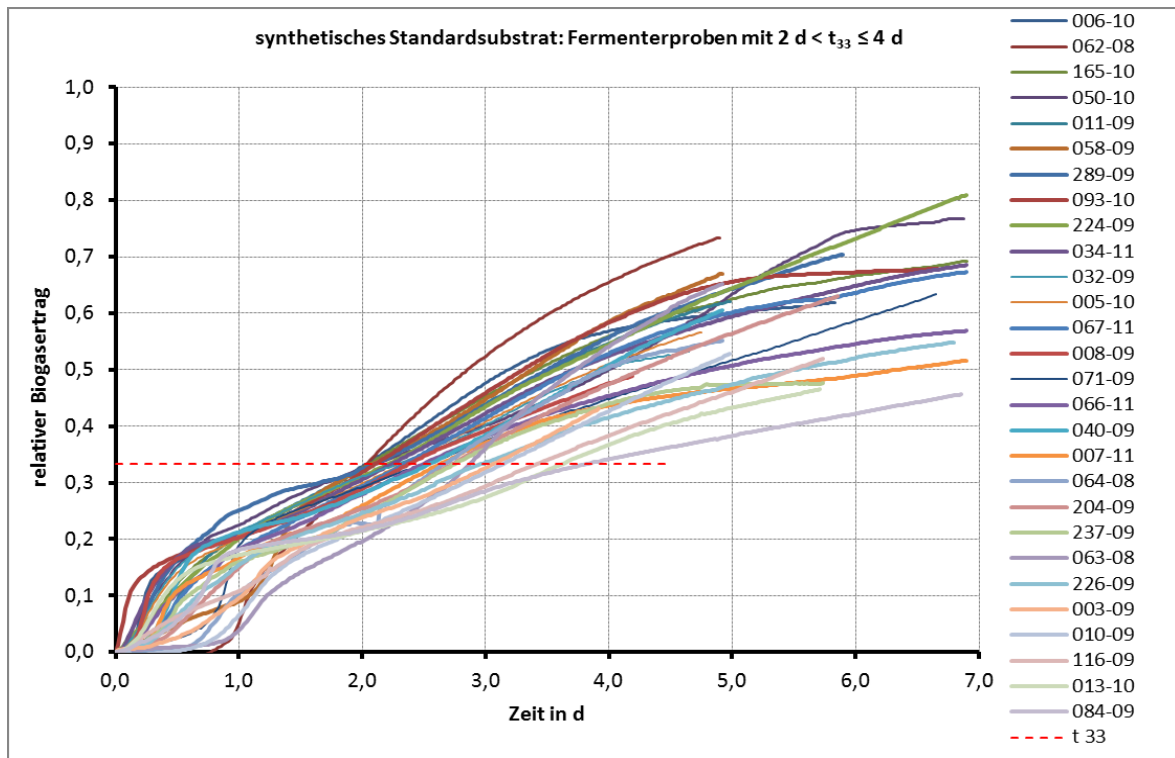


Abbildung A 11: Versuche mit synthetischem Standardsubstrat; normierte Gasbildungskurven der Fermenterproben mit  $t_{33} \leq 4 \text{ d}$

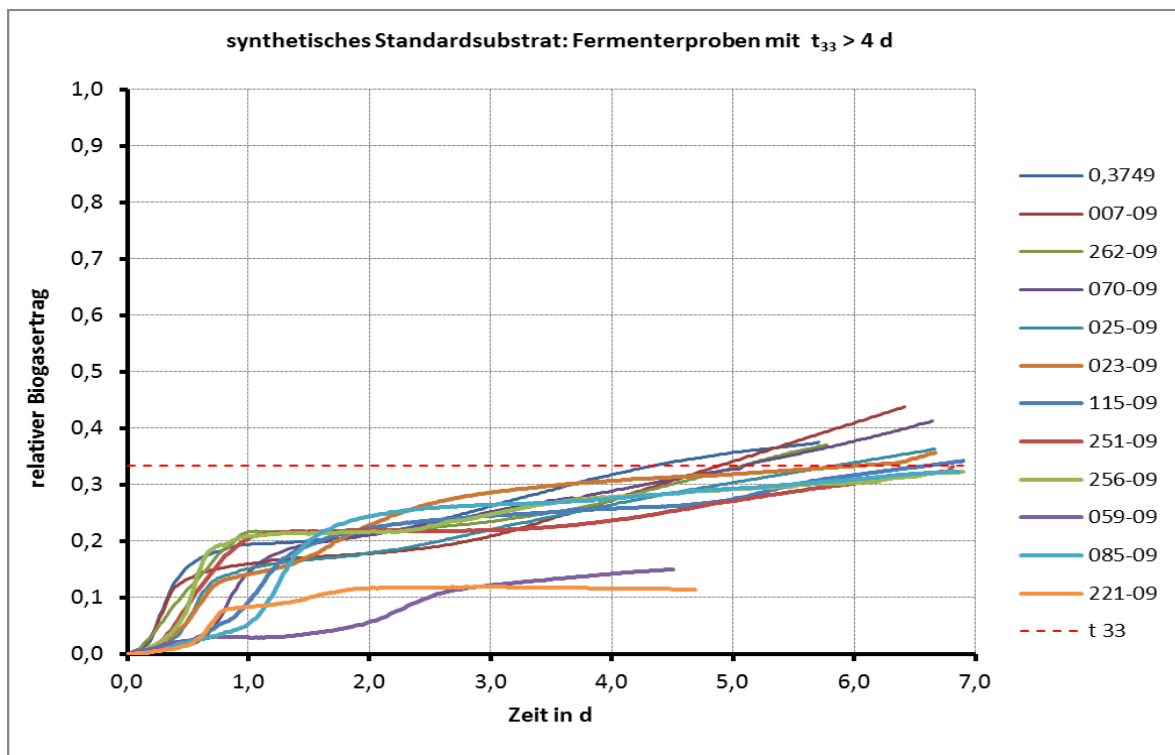
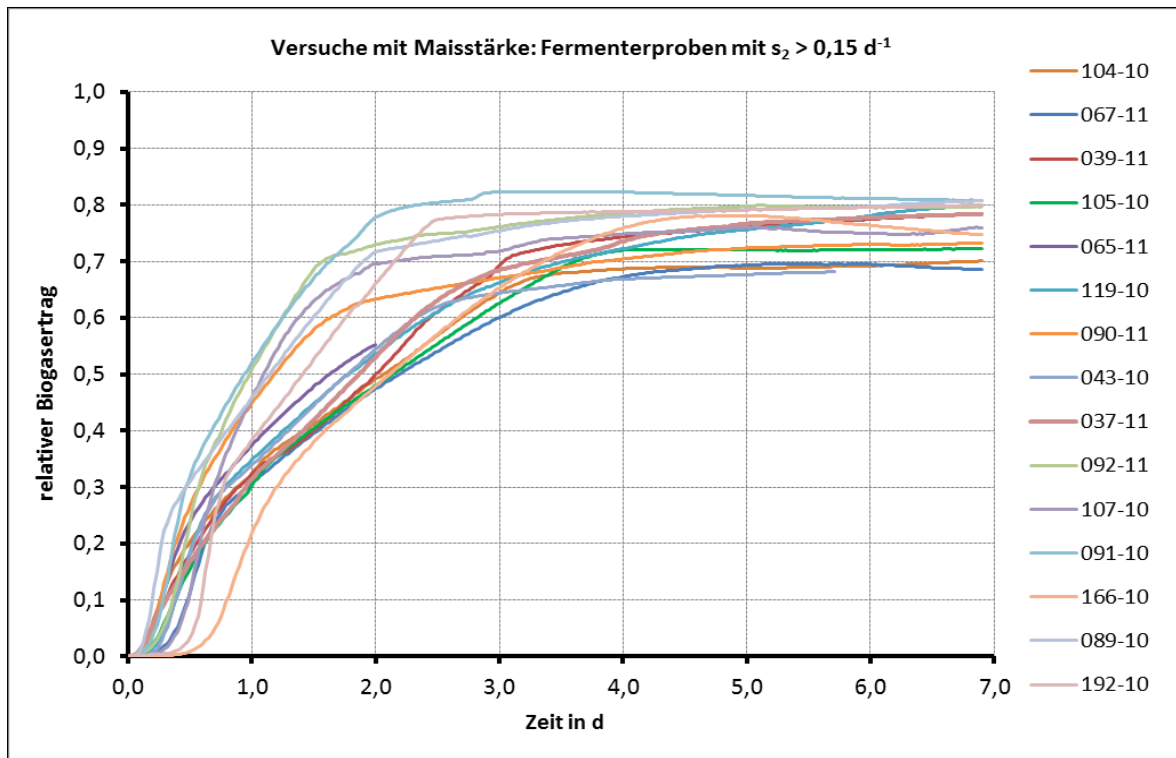
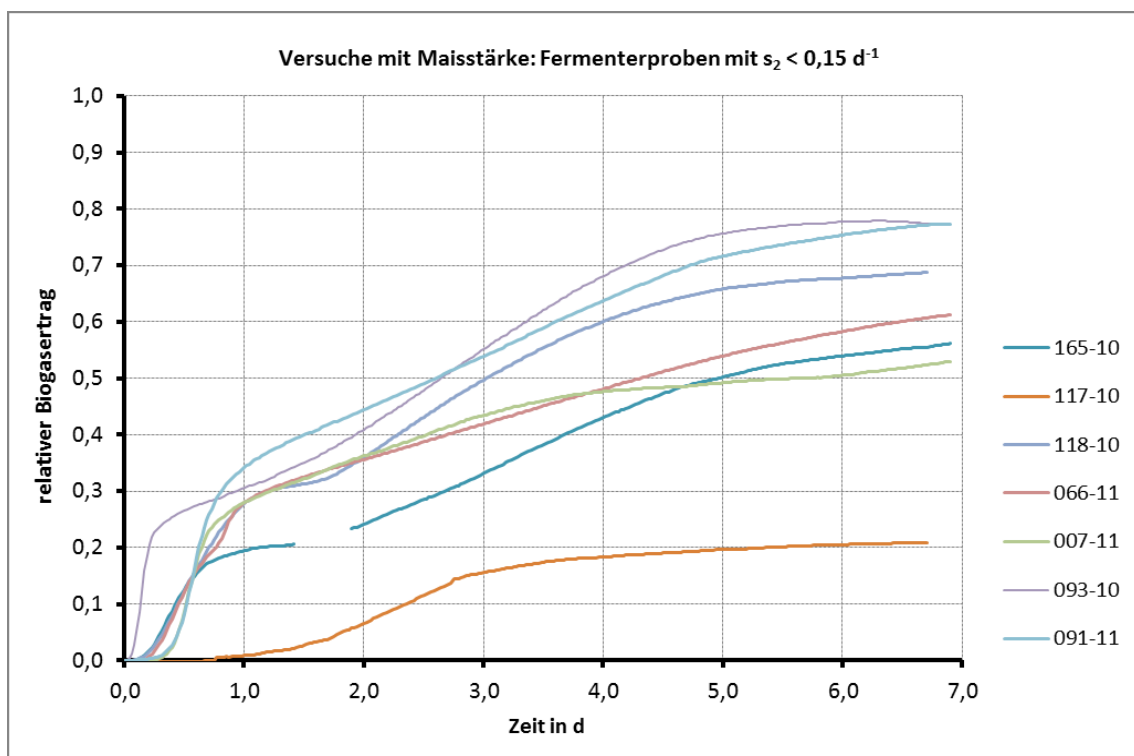


Abbildung A 12: Versuche mit synthetischem Standardsubstrat; normierte Gasbildungskurven der Fermenterproben mit  $t_{33} > 4 \text{ d}$

Abbildung A 13: Versuche mit Maisstärke; normierte Gasbildungskurven der  
Gruppe 2 mit  $s_2 > 0,15 \text{ d}^{-1}$ 

Fermenterproben der

Abbildung A 14: Versuche mit Maisstärke; normierte Gasbildungskurven der  
Gruppe 1 mit  $s_2 < 0,15 \text{ d}^{-1}$ 

Fermenterproben der